

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

## **IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.

16C1

Patent  
Attorney's Docket No. 032475-001

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of ) BOX AF  
Frederic KLEIN et al ) Group Art Unit: 1645  
Application No.: 09/155,982 ) Examiner: Virginia Allen Portner  
Filed: October 9, 1998 ) Confirmation No.: 9420  
For: MEANS FOR DETECTING BACTERIA )  
OF THE TAYLORELLA )  
EQUIGENITALIS SPECIES AND )  
THEIR BIOLOGICAL APPLICATIONS )

RECEIVED  
TECH CENTER 1600/2900  
03 APR 14 PM 3:29

RECEIVED  
APR 16 2003  
TECH CENTER 1600/2900

**TRANSMITTAL LETTER**

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

Enclosed is a copy of the Friedrich thesis, a partial translation and a Declaration attesting to the accuracy of the translation.

No additional fee is required.

The Commissioner is hereby authorized to charge any appropriate fees under 37 C.F.R. §§ 1.16, 1.17, 1.20(d) and 1.21 that may be required by this paper, and to credit any overpayment, to Deposit Account No. 02-4800. This paper is submitted in duplicate.

Respectfully submitted,

BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.

By: 

Donna M. Meuth  
Registration No. 36,607

P.O. Box 1404  
Alexandria, Virginia 22313-1404  
(703) 836-6620

Date: April 14, 2003

## **4.2. Results**

### **4.2.1. Bacteriological pathogen detection results**

#### **Study period I:**

After the intrauterine infection of the pony mare, the pathogen could be reisolated from the uterine exudate on the following day.

*T. equigenitalis* was cultured in the samples taken in the one to three day interval up to the 31<sup>st</sup> d.p. inf. from clitoral, cervical and uterine swabs and from uterine exudate and uterine discharge samples.

After the infected pony mare (31 d.p.inf.) had mated with pony stallion 1, the pathogen could be reisolated in the samples taken from the pony stallion from the 4<sup>th</sup> d.p.inf. The pathogen was detected in all 5 sample materials, with the highest value detected in the pre-seminal fluid. The pathogen could be isolated regularly in the period from the 4<sup>th</sup> to the 75<sup>th</sup> d.p.inf. During this period, a significant reduction in the number of small and large *T. equigenitalis* colonies growing on the nutrient medium was observed. From the 83<sup>rd</sup> d.p.inf to the 147<sup>th</sup> d.p.inf., it was only possible to detect isolated bacteria morphologically indicating *T. equigenitalis* between strongly represented coryneform germs microscopically in Gram preparations (Gram negative soft bacilli or Gram negative cocci). The pure culture required for the identification could not be obtained with the subcultures used. The bacteriological tests conducted on the 161<sup>st</sup> and 173<sup>rd</sup> d.p.inf. gave further positive results. In this case, only some small colonies developed from the 7<sup>th</sup> day of incubation. During the 4<sup>th</sup> subculture, these colonies supplied further large and small colonies. After the large colony type had been eliminated, the coryneform germs, also growing very slowly on blood agar dishes, caused major difficulties in obtaining pure cultures from the small *T. equigenitalis* colony type. A summarised overview of the results of the bacteriological tests on pony stallion 1 is given in Table 5.

Table 5: Reisolation of *T. equigenitalis* in an experimentally infected pony stallion (Animal 1)

d.p.inf.	Body of penis	Urethra <sup>1</sup>	Nav. fossa <sup>2</sup>	PSF <sup>3</sup>	Ejaculum <sup>4</sup>
-34	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
-14	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
-1	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
4	+	+	+	+	/
6	+	+	/	/	/
8	+	Ø	Ø	+	/
11	+	Ø	+	+	+
13	+	+	+	+	/
15	Ø	Ø	Ø	+	/
18	+	Ø	+	Ø	/
20	+	Ø	+	+	/
22	+	+	+	+	/
25	+	+	+	+	/
27	+	Ø	+	+	/
75	Ø	+	+	+	/
83	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
91	u.	Ø	u.	Ø	/
110	Ø	Ø	Ø	u.	/
131	Ø	u.	u.	Ø	/
138	u.	u.	u.	u.	/
147	Ø	Ø	u.	Ø	/
161	Ø	/	+	Ø	/
173	Ø	Ø	Ø	+	+

Key: Ø Negative pathogen detection  
+ Positive pathogen detection  
u Microscopic detection of uncertain cultures  
/ No samples taken

<sup>1</sup> HR = Harnröhre

<sup>2</sup> EG = Eichelgrube

<sup>3</sup> VS = Vorsekret

<sup>4</sup> Eja = Ejakulat

## Study period II:

The successful initiation of the infection in pony stallion 2 was verified with positive results in the bacteriological study of the samples taken from the 3<sup>rd</sup> d.p.inf. In this case, a constant decrease in the *T. equigenitalis* colonies growing on the nutrient media was observed up to the 21<sup>st</sup> d.p.inf. It was clearly noted that, from the 17<sup>th</sup> d.p.inf., no more large colony variants developed. From the 3<sup>rd</sup> d.p.inf. to the 14<sup>th</sup> d.p.inf., both small and large colonies were observed, with the latter visible from 48 hours of incubation time and the former only visible between the 6<sup>th</sup> and the 8<sup>th</sup> day of incubation. From the 17<sup>th</sup> d.p.inf., only small colonies, only visible from the 6<sup>th</sup> to the 8<sup>th</sup> day of incubation, developed. In the third subculture of these small colonies, further large and small colony variants were recorded. From the 24<sup>th</sup> d.p.inf. to the 84<sup>th</sup> d.p.inf. and from the 131<sup>st</sup> to the 240<sup>th</sup> d.p.inf., all the tests to reisolate *T. equigenitalis* were negative. On the 260<sup>th</sup> and 289<sup>th</sup> d.p.inf. and on the 367<sup>th</sup> and 386<sup>th</sup> d.p.inf., isolated Gram negative soft bacilli or coccal bacteria could be detected between strongly represented coryneform germs in the bacteriological examination of navicular fossa swabs in Gram preparations, which were composed of morphologically uncertain colonies from the original smear. However, since the subcultures used to obtain the pure cultures required for the final identification of *T. equigenitalis* were not successful, it was only possible to express an uncertain result. From the 333<sup>rd</sup> d.p.inf. to the 355<sup>th</sup> d.p.inf. and on the 398<sup>th</sup> d.p.inf., complete pathogen detection was again obtained, i.e. the pathogen was identified morphologically in the Gram preparation and biochemically and serologically after subculture. In this case, only small colonies, visible from the 8<sup>th</sup> day of incubation could be observed. During the subculture of these colonies, large colonies developed, which were isolated in the third subculture on the 5<sup>th</sup> day of incubation and proliferated in the fourth subculture on the 3<sup>rd</sup> day of incubation.

The strongly represented coryneform germs in the samples represented a significant handicap in the bacteriological test for *T. equigenitalis* in the infection test phases, in which no more large colony types developed in the original smear, due to their massive development and their identical growth rate and similar colony morphology in relation to the small *T. equigenitalis* colony type.

Since Test animal 2 was not yet sexually mature at the beginning of the study (first ejaculum was free of sperm), it was only possible to take a few pre-seminal fluid or ejaculum samples due to insufficient or low sexual libido up to the 159<sup>th</sup> d.p.inf.

An overview of the results of the bacteriological *T. equigenitalis* detection tests on pony stallion 2 is given in Table 6.

Table 6: Reisolation of *T. equigenitalis* in an experimentally infected pony stallion (Animal 2)

d.p.inf.	Body of penis	Urethra	Nav. fossa	PSF	Ejaculum
-16	Ø	Ø	Ø	/	/
-9	Ø	Ø	Ø	/	/
-2	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
3	Ø	Ø	+	+	/
7	Ø	Ø	+	+	/
10	Ø	Ø	+	/	/
14	Ø	Ø	+	/	/
17	Ø	Ø	+	/	/
21	Ø	Ø	+	/	/
24	Ø	Ø	Ø	/	/
31	Ø	Ø	Ø	/	/
35	Ø	Ø	Ø	/	/
42	Ø	Ø	Ø	/	/
49	Ø	Ø	Ø	/	/
56	Ø	Ø	Ø	/	/
84	Ø	Ø	Ø	/	/
91	Ø	Ø	+	/	/
98	Ø	Ø	+	/	/
131	Ø	Ø	Ø	/	/
146	Ø	Ø	Ø	/	/
159	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
173	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
219	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
240	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
260	Ø	Ø	u.	Ø	Ø
289	Ø	Ø	u.	Ø	Ø
319	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
333	Ø	Ø	Ø	+	Ø

Table 6 (continued): Reisolation of *T. equigenitalis* in an experimentally infected pony stallion (Animal 2)

d.p.inf.	Body of penis	Urethra	Nav. fossa	PSF	Ejaculum
351	Ø	Ø	Ø	+	Ø
355	Ø	+	Ø	Ø	Ø
367	Ø	Ø	u.	u.	u.
386	Ø	Ø	u.	Ø	Ø
398	Ø	Ø	Ø	u.	+

Key: Ø Negative pathogen detection  
 + Positive pathogen detection  
 u Microscopic detection of uncertain cultures  
 / No samples taken

The bacteriological study for *T. equigenitalis* on the uterine, cervical and clitoral swabs taken from the pony mare four times in the interval from 14 to 30 days before mating with pony stallion 2. On the third and fifth day after mating with the pony stallion mentioned above, *T. equigenitalis* could be detected in culture on cervical and uterine swabs. In this case, isolated large colonies could be observed on the third day of incubation and further abundant small colonies on the seventh day of incubation. On the 14<sup>th</sup> day after the first mating, *Taylorella* were isolated from the clitoral swab for the last time. The further four bacteriological tests on clitoral, cervical and uterine swabs for each 10-day interval were negative.

#### 4.2.2. Clinical progression of *Taylorella* infection

In the course of the infection study, both infected pony stallions showed no clinical symptoms which could be attributed to the effect of *T. equigenitalis*. Symptoms of slight colic were observed in pony stallion 2 on the 237<sup>th</sup> and 238<sup>th</sup> d.p.inf.

#### 4.2.3. Serological study results

The results of the serological study for both pony stallions are summarised in Tables 7 and 8.

Table 7: Serological study results for pony stallion 1

d.p.inf.	SAT	HT	PHA	CFT	IFT
-40	1:5	1:5	Ø	Ø	Ø
0	Ø	Ø	Ø	Ø	1:10
7	Ø	1:5	Ø	Ø	1:10
14	Ø	1:5	Ø	Ø	Ø
22	Ø	1:5	Ø	Ø	Ø
28	Ø	1:5	Ø	Ø	Ø
75	Ø	1:5	Ø	Ø	Ø
83	Ø	1:5	Ø	Ø	Ø
91	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
110	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
138	Ø	1:5	Ø	Ø	Ø
168	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø



Table 8: Serological study results for pony stallion 2

d.p.inf.	SAT	HT	PHA	CFT	IFT
-1	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
3	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
7	1:10	Ø	Ø	Ø	Ø
10	1:10	Ø	Ø	Ø	Ø
14	1:10	Ø	Ø	Ø	Ø
17	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
21	1:10	Ø	Ø	Ø	Ø
24	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
28	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
35	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
42	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
49	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
56	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
84	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
91	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
98	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
131	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
146	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
156	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
219	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
240	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
260	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
388	1:10	Ø	Ø	Ø	1:10
403	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
423	1:10	Ø	Ø	Ø	1:10

#### 4.2.4. Haematological study results

The results of the study of the red and white blood cell count for pony stallion 1 and pony stallion 2 are given in Tables 9, 10, 10 and 12.

Table 9: Haematological study results for a pony stallion infected with *T. equigenitalis* (Animal 1)

d.p.inf.	Hb, old	Hb, new	HC	Ery	MCV	MCH	MCHC
-34	11.1	6.89	30	7.29	41.2	15.2	37.0
0	11.5	7.14	34	8.83	38.5	13.0	33.8
7	13.3	8.25	36	9.41	38.3	14.1	36.9
14	13.6	8.44	36	7.53	20.5	18.1	37.8
28	15.1	9.37	39	11.14	35.0	13.5	38.7
83	11.8	7.32	32	9.55	33.5	12.4	36.9
91	10.2	6.38	28	8.25	33.9	12.4	36.4
169	12.8	7.84	35	7.84	45.8	16.8	36.6
173	14.1	8.75	39	8.09	48.2	17.4	36.2

Table 10: Differential blood count for a pony stallion infected with *T. equigenitalis* (Animal 1)

d.p.inf.	Bas	Eos	Myel	Granulocytes				sm.Ly	l.Ly	Mon	Leu
				Imm	nbf	bf	sgm				
-34	0	5	0	0	0	9	34	34	19	0	6450
0	0	6	0	0	13	12	31	31	6	2	5800
7	0	5	0	1	17	10	31	31	3	2	4000
14	0	3	0	0	1	16	22	52	4	0	7300
28	0	3	0	0	0	11	32	47	7	0	6400
83	0	4	0	0	0	12	22	57	3	1	6300
91	0	1	0	0	0	28	11	53	6	1	6050
169	0	3	0	0	0	2	30	43	20	2	6650
173	0	2	0	0	2	3	22	37	34	0	7600

Table 11: Haematological study results for a pony stallion infected with *T. equigenitalis*  
(Animal 2)

d.p.inf.	Hb, old	Hb, new	HC	Ery	MCV	MCH	MCHC
-1	10.3	6.39	32	10.19	43.4	10.1	32.2
3	10.9	6.74	37	7.59	48.7	14.4	29.5
7	9.4	5.83	36	8.08	44.6	11.6	26.1
10	15.8	9.80	41	10.49	39.1	15.1	38.5
14	13.8	8.56	35	8.01	43.7	17.2	39.4
17	13.7	8.50	36	8.55	43.1	16.0	38.1
21	15.3	9.49	39	9.49	42.1	16.5	39.2
24	14.0	8.69	38	9.04	42.0	15.5	36.8
28	13.9	8.63	33	7.91	41.7	17.6	42.1
35	13.7	8.50	37	8.72	42.4	15.7	37.0
42	13.3	8.25	34	8.81	38.6	15.1	39.1
49	11.6	7.20	35	8.12	43.1	14.3	33.1
56	14.0	8.69	38	9.50	40.0	14.7	36.8
84	11.9	7.38	33	7.84	42.1	15.2	36.1
91	10.7	6.64	38	7.23	52.6	14.8	28.2
98	10.5	6.52	37	8.99	41.2	11.3	28.4
131	12.8	7.94	34	9.21	36.9	13.9	37.6
146	13.2	8.19	35	9.01	38.8	14.7	37.7
156	12.9	8.01	36	8.64	41.7	14.9	35.8
219	12.6	7.82	34	7.64	44.5	16.5	37.1
240	11.2	6.95	31	7.10	43.7	15.8	36.1
260	14.4	8.94	38	8.78	43.3	16.4	37.9
388	15.8	9.80	38	8.50	44.7	18.6	41.6
403	12.3	7.63	34	8.11	41.9	15.2	36.2
423	13.8	8.56	38	9.36	40.6	14.7	36.3

Table 12: Differential blood count for a pony stallion infected with *T. equigenitalis* (Animal 2)

d.p.inf.	Bas	Eos	Myel	Granulocytes				sm.Ly	l.Ly	Mon	Leu
				Imm	nbf	bf	sgm				
-1	0	0	0	0	1	10	34	34	17	4	7950
3	0	2	0	0	0	2	20	27	47	2	8700
7	0	1	0	0	0	3	20	25	48	3	12000
10	0	2	0	0	1	3	27	43	22	2	10100
14	0	1	0	0	0	2	31	26	38	2	11500
17	0	1	0	0	0	5	23	31	36	4	10850
21	0	4	0	0	0	3	31	21	38	3	11150
24	0	0	0	0	0	6	21	25	48	0	9550
42	0	3	0	0	0	10	27	38	20	2	10200
49	0	1	0	0	0	11	29	13	45	1	8850
56	0	0	0	0	0	2	26	38	34	0	12600
84	0	3	0	0	2	10	23	11	50	1	9750
91	1	6	0	0	0	2	33	13	43	2	9550
98	0	2	0	0	0	7	31	35	22	3	10450
131	0	6	0	0	0	5	27	30	31	1	9200
146	2	4	0	0	0	6	22	25	41	0	8350
156	0	3	0	0	1	8	27	35	25	1	8350
219	0	1	0	0	0	7	32	23	36	1	8650
240	0	0	0	0	5	6	3	30	56	0	4450
260	0	1	0	0	0	6	24	22	47	0	10300
388	0	1	0	0	1	7	39	29	23	0	9750
403	0	6	0	0	1	6	20	23	40	4	7050
423	0	6	0	0	0	8	27	28	30	1	10400

#### 4.2.5. Post mortem *T. equigenitalis* detection in culture

In the post mortem study of the urinary and genital organs of both pony stallions, *T. equigenitalis* could only be reliably detected in the external genital organs. In the studies of the ancillary genital glands, gonads and bladders, on the other hand, microscopically uncertain bacteria, i.e. bacteria indicating *T. equigenitalis* in the Gram preparation, were observed. However, these bacteria could not be identified further during to an absence of growth in the subculture study, so an uncertain result could only be expressed. The *T. equigenitalis* colonisation of the positive organs in the bacteriological study was very insignificant except for the primary and secondary navicular fossae.

The study of the urinary tract organs (except for the bladder) and the lymph nodes were negative.

The horse blood agar dishes used in the study of the organs of pony stallion 1 supplemented with different quantities of oxacillin and lincomycin did not show any advantage over nutrient media without antibiotic supplements. In the event of positive pathogen detection, growth of small *T. equigenitalis* colonies was only observed from the ninth day of incubation. In the subsequent subcultures, germ growth developed between the second and fifth day of incubation. In the post mortem study of the organs removed from pony stallion 2, in the case of positive results, incubation periods of 7 days (navicular fossae) to 9 days (urethra, glans, body of penis) were required to observe developed small colony variants. In the subculture, these variants also showed growth between the second and fifth day of incubation.

The results of the post mortem bacteriological studies are summarised in Table 13.

Table 13: Post mortem bacteriological detection of *T. equigenitalis* in two experimentally infected pony stallions

Study material	Stallion 1	Stallion 2
Lnn. inguinales supff.	Ø	Ø
Lnn. renales	Ø	Ø
Lnn. sacrales intt.	Ø	Ø
Lnn. sacrales extt.	Ø	Ø
Lnn. coeliaci	Ø	Ø
Lnn. ilici medd.	Ø	Ø
Lnn. hypogastrici	Ø	Ø
Lnn. lumbales aortici	Ø	Ø

Table 13 (continued): Post mortem bacteriological detection of *T. equigenitalis* in two experimentally infected pony stallions

Study material	Stallion 1	Stallion 2
Kidney	Ø	Ø
Pelvis of kidney	Ø	Ø
Ureter	Ø	Ø
Bladder	u.	u.
Testicles	u.	u.
Epididymal head	u.	u.
Epididymal body	Ø	Ø
Epididymal tail	u.	u.
Vas deferens	Ø	Ø
Ampullae of vas deferens	u.	Ø
Prostate gland	Ø	u.
Seminal vesicles	Ø	u.
Bulbourethral glands	Ø	Ø
Urethra (proximal section)	+	Ø
Urethra (median section)	+	+
Urethra (distal section)	+	+
Glans	S	S
Primary navicular fossa	+	+
Secondary navicular fossa	+	+
Prepuce	S	S
Body of penis	+	S

Key: Ø Negative pathogen detection

+ Positive pathogen detection

u Microscopic detection of uncertain cultures

S Dishes overgrown with spore formation

#### **4.2.6. Pathological study results**

In the anatomicopathological studies of the internal and external genital organs and urinary tract organs conducted after the euthanasia of both pony stallions and in the histopathological studies of the above-mentioned organs of pony stallion 1, no modifications could be observed.

In the histopathological study of the urinary and genital organs of pony stallion 2, the following pathological modifications were observed. The seminal vesicle comprised isolated circumscribed lymphohistiocytic infiltrations (Fig. 1).

In the testicles, isolated giant cells developed and sperm production was considerably reduced (Fig. 2). In conjunction, the epididymal ducts proved to be partially free of sperm (Fig. 3).

In the region of the distal urethra, lymph follicles were observed. The study of the secondary navicular fossa detected subepithelial lymphohistiocytic infiltrates.

**Fig. 1: Lymphohistiocytic infiltrates in the seminal vesicle (19-fold magnification)**

Fig. 2: Giant cell in lumen of epididymal ducts (125-fold magnification)

Fig. 3: Epididymis, duct partially free of sperm (19-fold magnification)



#### 4.2.7. Immunohistological detection of *T. equigenitalis*

In the IFT study of the organ and tissue sections of pony stallion 2 using the double labelling technique, isolated fluorescences developed at the same location in the tissue when stimulated with UV light and green light in the seminal duct of the testicles (Fig. 4, Fig. 5) and in the lumen of the seminal vesicle.

Specific fluorescences were also observed in the mucous membrane folds of the glans and urethra. In the study of the primary and secondary navicular fossae, amplified fluorescent bacteria could be observed, particularly in the latter. With the stimulation of the FITC conjugate, both bacilli and cocci showed a marked membrane fluorescence, while with rhodamine conjugate stimulation, only bacilli were fluorescent.

The immunohistological studies of the regional lymph nodes, kidney, ureter, bladder, epididymis, vas deferens, ampulla of the vas deferens, prostate gland, bulbourethral glands and prepuce were negative.

Fig. 4: Fluorescence in the epididymal duct with FITC stimulation (immersion in oil, 1000-fold magnification).

Fig. 5: Fluorescence in the epididymal duct with rhodamine stimulation (same section of image as Fig. 4, immersion in oil, 1000-fold magnification).

#### **4.2.8. Immune serum production in rabbits**

All three vaccinated rabbits showed a rapid rise in the antibody titre, which reached a plateau after the booster dose (Fig. 6).

Fig. 6: Progression of the anti-T. equigenitalis antibody titre measured in PHA in the serum of 3 immunised rabbits

Serum antibodies

Animal 1

Animal 2

Animal 3

d.p.vacc.

The pooled rabbit serum had the following anti-T. equigenitalis antibody titres with the serological detection methods applied: RAT 1:128, PHA 1:1280, SAT: 1:320, HT: 1:160, CFT: 1:512, IFT: 1:512. In the RAT, agglutination only occurred with Actinobacillus equuli when undiluted serum was used, which, however, did not occur at the next highest dilution factor of 1:2. No cross-reactions with any other bacterial strains tested could be observed.

#### 4.2.9. Monoclonal antibody characterisation

The Balb/c mice immunised with 3 different antigen preparations showed anti-T. equigenitalis antibodies with the ELISA technique 2 weeks after the primary immunisation. The titres increased further after the booster injection, reached their peak between the 90<sup>th</sup> and 130<sup>th</sup> d.p.vacc. and began to fall after that. The table below gives the titre dynamics.

Table 14: Titre progression in immunised Balb/c mice

d.p.vacc.	Mouse 1	Mouse 2	Mouse 3	Mouse 4	Mouse 5	Mouse 6
0	negative	negative	negative	negative	negative	negative
14	1:2560	1:2560	1:640	1:640	1:320	1:640
21	1:10240	1:10240	1:5120	1:2560	1:2560	1:2560
35	1:5120	1:5120	1:5120	1:5120	1:5120	1:5120
70	1:10240	1:5120	1:10240	1:10240	1:10240	1:10240
90	1:10240	1:5120	1:10240	1:10240	1:20480	1:20480
110	1:10240	1:5120	1:10240	1:5120	1:10240	1:10240
130	1:5120	1:5120	1:10240	1:5120	1:5120	1:5120
142	1:5120	1:5120	1:5120	1:5120	1:5120	1:5120
207					1:5120	1:5120
Final titre	1:5120	1:5120	1:5120	1:5120	1:2560	1:2560

In the fusion reactions, in which the murine myeloma cell line P3X63-Ag8 was used as the fusion partner, no stable antibody-producing hybridoma cell lines could be established. On the other hand, in the 3 fusion reactions with the heteromyeloma cell line CB-F7 as the fusion partner, 89 antibody-producing hybridoma cell lines were established. After the study of 45 different clones with the Western blot technique, the clones TF I 10D5, TF II 8D4, TF III 10G5, TF III 11B5, TF III 11B5, TF III 11E5, TF III 7D4, TF III 7D4, TF III 3G3, TF III 3E8 were selected from the total quantity for further characterisation due to their different reactions with the Immunoblot technique.

Figure 7 documents the Immunoblot reactivity of the mAb directed against *T. equigenitalis*. The mAb TF II8D4 was the only of the mAb selected not to show a clear reaction with a specific protein. The total NC band (No. 9) was diffusely stained. The accompanying negative control (No. 10) and the conjugate control (No. 11) showed a weak non-specific reaction with a 19 KD protein. This reaction was present on all the NC bands.

Fig. 7: mAB Immunoblot reactivity against *T. equigenitalis*

Key:	No.:	1 Molecular weight marker	7 TF III 11B5
		2 TF I 10D2	8 TF III 3G3
		3 TF III 7D4	9 TF II 8D4
		4 TF III 10G5	10 Kufu 2
		5 TF III 3E8	11 Conjugate control
		6 TF III 11 <sup>E</sup> 5	12 Mouse serum

The immunoglobulin subclasses, the ELISA and IFA titre of the residual hybridoma and the relative molecular weights of the *T. equigenitalis* proteins detected with the Immunoblot technique are summarised in Table 15.

Table 15: Properties of anti-*T. equigenitalis* mAb

mAb	Immunoglobulin subclass	ELISA / IFT titre	Molecular weight of detected proteins
TF I 10D2	IgG <sub>2</sub> a	1:128/1:10	13 kD
TF II 8D4	IgM	1:8192/1:320	no reaction
TF III 11E5	IgG <sub>2</sub> a	1:8192/1:320	56 kD
TF III 11B5	IgG <sub>2</sub> a	1:8192/1:320	70 kD, 117 kD
TF III 10G5	IgG <sub>1</sub>	1:8192/1:10	35 kD
TF III 7D4	IgG <sub>2</sub> a	1:5121/1:5	22 kD
TF III 3G3	IgG <sub>2</sub> a	1:128/1:10	47 kD, 70 kD
TF III 3E8	IgG <sub>1</sub>	1:128/1:10	47 kD

The study of the selected mAb with the ELISA technique with respect to their ability to detect different *T. equigenitalis* isolates showed differences in the antigen structure of this species. The *T. equigenitalis* strain I/3 is not detected by the mAb TF 11E5 (Fig. 12) and the strain BW 26 is not detected by the mAb TF I 10D5 with the ELISA technique (Fig. 9). In addition to these qualitative differences, quantitative differences are also observed. These marked differences in the extinctions measured occurred, with the exception of the mAb TF II 8D4, in all the other mAb tested. The results of the specificity test are represented in Figures 9 to 19 in the table appendix.

In the study of potential cross-reactions of all the mAb used with representatives of different bacterial species, no antigenic affinities could be detected. Potential antigenic affinity of *T. equigenitalis* with *Streptococcus zooepidemicus* and *Streptococcus equi* cannot be proven due to the non-specific fixation of the conjugate used represented in the figure (Fig. 19).

The results of the examination of the mAb with respect to their ability to detect different *Taylorella* isolates and representatives of different bacterial species with the ELISA technique are illustrated in Figures 9 to 16.

While the mAb Kufu 2 used as the negative control did not react with the *Taylorella* strains under test or with the other bacterial species, the mouse immune serum used as the positive

control showed weak-positive reactions (extinction > 300) with the majority of the bacterial species used. The strongest reaction occurred with *Haemophilus somnus*, *Micrococcus albus* and *Bordetella bronchiseptica* (Fig. 17).

With the IFT technique, of all 8 mAb under study, only the mAb of the clones TF II 8D4, TF II 11B5 and TF III 11E5 showed very good fluorescence up to a dilution factor of 1:320 (Fig. 8). The remaining mAb only reacted at dilution factors from 1:5 to 1:10. The mAb detected the baccillary form and coccoid form of *T. equigenitalis* present in the culture material in a similar fashion.

Fig. 8: mAb TF III 11E5 reaction with the IFT technique

## 5. Discussion of results

### Bacteriological and clinical study results

After the mating of pony stallion 1 with the *T. equigenitalis*-positive pony mare, the pathogen was isolated in swabs from the body of the penis, urethra, navicular fossa, pre-seminal fluid and ejaculum. After the mating of pony stallion 2 with the pony mare, *T. equigenitalis* was also successfully transmitted to the pony mare, thus demonstrating the reciprocal transmissibility of the pathogen by means of mating.

TAINTURIER et al. (1982a) also succeeded in transmitting *T. equigenitalis* by means of mating from one infected mare to a total of 8 stallions.

In a transmission study with trotter stallions and mares, SCHLÜTER et al. (1991) were able to demonstrate that mating with an infected mare did not necessarily result in pathogen transmission. The authors did not succeed in detecting the pathogen in 2 stallions, which had mated with a *T. equigenitalis*-positive mare several times.

To determine to what extent the adhesion of the infection after the transmission of the pathogen is breed- or age-dependent or whether individual predisposing factors are involved, further studies are required.

The CEM pathogen was most frequently detected in pony stallion 1 in the pre-seminal fluid with 11 positive results, while the swabs from the urethra only gave 6 positive results. With 10 positive pathogen detections, respectively, the results of the bacteriological studies of the body of the penis and navicular fossa equal those for the pre-seminal fluid. In the ejaculum, the pathogen was detected twice in a total of three samples taken.

A completely different picture was observed with respect to the bacteriological studies in study period II in the bacteriological test on pony stallion 2. In spite of the intraurethral inoculation with *T. equigenitalis*, the pathogen was only detected on the 355<sup>th</sup> d.p.inf. in the urethra. The ejaculum studies gave one positive result and that of the pre-seminal fluid gave 4 positive results. With a total of 8 *Taylorella* detections, the navicular fossa swabs from this animal showed the most frequent detection of the pathogen, whereas, in the swabs from the body of the penis, the CEM bacterium was not detected over the entire study period of 433 days.

The negative pathogen results in the swabs from the body of the penis could be related to the differing mode of infection in study period I, since in the natural mating, the entire body of the penis of pony stallion 1 came into contact with the *Taylorella*-infected vaginal mucous membrane, while pony stallion 2 was infected by the intraurethral route.

TAINTURIER et al. (1982a) were also unable to isolate the pathogen in the body of the penis in a total of 3 pony stallions infected by the intraurethral route.

Comparing the positive study results in both pony stallions shows that the pathogen cannot be cultured in a reproducible manner from any part of the external stallion genitals, with respect to a high accuracy of detection of the direct pathogen detection, although *T. equigenitalis* was more frequently reisolated from swabs from the navicular fossa overall in both study periods. Only the study of all the samples involved in the pathogen detection (swabs from the body of the penis, navicular fossa, urethra, pre-seminal fluid and ejaculum) offers the best condition for successful detection of *T. equigenitalis*.

PLATT et al. (1978) described a procedure similar to study period II for bacteriological reisolation in 4 artificially infected pony stallions. The authors obtained the highest rate of *T. equigenitalis* detection in swabs from the navicular fossae, whereas the bacteriological studies of the samples from the body of the penis were mostly negative.

LORIN et al. (1984) succeeded in detecting the pathogen eleven times in bacteriological studies on samples materials from 11 naturally infected stallions in swabs from the navicular fossa, while only 4 samples from the urethra and one sample from the body of the penis and ejaculum, respectively, were positive.

The results with respect to the high rates of *T. equigenitalis* detection in navicular fossa swabs obtained in some reisolation studies and illustrated in the literature supported the hypothesis formulated by SIMPSON and EATON-EVANS (1978) and HAZARD et al. (1979), that, as the main site of colonisation, the navicular fossa in the stallion is the anatomical equivalent to the clitoral sinus in the mare.

With its low acidic and moist medium, the secondary navicular fossa, constantly filled with smegma, offers the ideal colonisation site for *T. equigenitalis*.



The persistence of *T. equigenitalis* lasting up to the 173<sup>rd</sup> d.p.inf. in pony stallion 1 to the 389<sup>th</sup> d.p.inf. in pony stallion 2 underlines the possibility of the pathogen persisting for several months already demonstrated by TIMONEY and POWELL (1982) and TIMONEY and STRICKLAND (1982).

The fact that, after the infection of the stallion with the CEM pathogen, rapid germ elimination may occur, is shown by an infection study by TAINTURIER et al. (1982a), which only succeeded in obtaining positive pathogen detections on the 9<sup>th</sup> d.p.inf. in a pony stallion infected by the intraurethral route. Further pathogen detections were negative.

The positive results obtained in pony stallion 1 in the bacteriological study on the pre-seminal fluid on the 15<sup>th</sup> d.p.inf. and on the pre-seminal fluid and ejaculum on the 173<sup>rd</sup> d.p.inf., along with the positive pathogen detections on the 333<sup>rd</sup> and 351<sup>st</sup> d.p.inf. in the pre-seminal fluid and on the 398<sup>th</sup> d.p.inf. in the ejaculum of pony stallion 2, with, at the same time, negative or uncertain results of the swabs from the body of the penis, navicular fossa and urethra studied support the assumption expressed by SCHLÜTER et al. (1990) on the possible colonisation of the internal genital organs in the stallion by *T. equigenitalis*. The authors formulated this suspicion due to pathogen detections in the pre-seminal fluid and sperm with concurrently negative results in swabs from the external genitals in a naturally infected stallion after a total of 8 treatment cycles.

The reduction observed in the *T. equigenitalis* colonies grown in the bacteriological study of the samples taken from both stallions and the transformation of the colony type from large, rapid-growth to the small, slow-growth colony type must be seen to be related to the inhibitory effect on the physiological bacterial flora described by SWERCZEK (1979c), DOLAN et al. (1984) and VAISSAIRE (1986) and the asymptomatic progression of CEM infection in the stallion. Since no data exists in the literature on the transformation of *T. equigenitalis* colony growth in stallion cultures, it is only possible to refer to publications on infection studies in mares. KANEMARU et al. (1988) infected thoroughbred and pony mares with culture material composed of the large colony type or of the small colony type. In this way, the mares infected with the large colony type showed typical CEM symptoms (endometritis, cervicitis, vaginitis), while the mares infected with the small colony showed no reactions at all.

SAHU and WEBER (1982) inoculated three pony mares with small colony type culture material and described a dependency of the severity of the clinical symptoms on the speed of the transformation from the small to the large colony type. While, in the first pony mare, almost exclusively large colonies were observed on the 3<sup>rd</sup> d.p.inf., the transformation in the two other pony mares lasted up to the 14<sup>th</sup> d.p.inf. Accordingly, strongly distinctive CEM symptoms were only observed in the first pony mare.

On the basis of the growth of the small colony type in the bacteriological study of pony stallion 2 on the 351<sup>st</sup> d.p.inf., it can be assumed that, during the mating of the pony stallion with the pony mare, exclusively slow-growth *Taylorella* were transmitted to the genital tract of the mare. Although, as early as the 3<sup>rd</sup> d.p.inf., large *Taylorella* colonies could be cultured in the uterine and cervical swabs, the pony mare only showed a slightly increased exudation. This clinical progression of the infection in the mare, which is not consistent with the above-mentioned results obtained by SAHU and WEBER (1982), can be explained by the reinfection of the pony mare in the mating. In the studies by TIMONEY et al. (1979c), SAHU et al. (1980) and FRIEDRICH (1989), reinfected pony mares showed no or only very mild clinical symptoms after *Taylorella* infection.

Since the small *T. equigenitalis* colony type which developed in the course of the bacteriological studies was difficult to distinguish morphologically from other very slow-growth accompanying germs, particularly coryneform germs, and, as a result, the subculture required for the diagnosis of *T. equigenitalis* to obtain pure *Taylorella* cultures was considerably difficult or partly impossible to make, the mAb produced within the scope of this study open up new possibilities in the identification of uncertain culture materials.

KANEMARU et al. (1988) and KAMADA et al. (1987) also describe problems in the identification of the small CEM pathogen colony type due to the similar slow growth rate of various accompanying germs.

It is only possible to make assumptions on the cause of the positive pathogen detection on the 333<sup>rd</sup> d.p.inf. after the phase with negative or uncertain study results lasting from the 131<sup>st</sup> d.p.inf. to the 319<sup>th</sup> d.p.inf. The pathogen content required for the bacteriological detection of *T. equigenitalis* could result from the repeated elimination of semen from the pony stallion due to sexual activity. Further studies are required to determine to what extent modifications in hormonal status or modifications in the physiological genital flora are involved in this process.

The growth period of the Taylorella colonies between 2 (large colony types) and 9 days (small colony type) indicate the possible time required for the detection of *T. equigenitalis* in swabs from stallions. The incubation time required in the primary isolation studies by WARD et al. (1984) in 39% of isolates also lasted more than 6 days.

In both study periods, no clinical symptoms which could be connected with *T. equigenitalis* infection developed in either pony stallion.

These observations are in line, except for a publication by LORIN et al. (1984), with the asymptomatic progression of CEM in stallions described in the international literature (PLATT et al. 1978, TAYLOR et al. 1978, TAINTURIER et al. 1979, 1981a, 1982a, ECKSTEIN 1983, ODA et al. 1983, VAISSAIRE et al. 1986, 1987, Köhler 1987).

LORIN et al. (1984) observed, in an infected stallion, one-sided, high-grade painful, indurated and therapeutically responsive orchitis, with concurrent detection of mycoplasmas in the ejaculum. However, the question in relation to which of the pathogens mentioned above this condition can be attributed remains open.

#### **Haematological and serological study results**

In the haematological monitoring of both pony stallions, over the entire study period, the results of the red and white blood cell counts were, with a few exceptions, within the limits of the specifications defined by KOLLAKOWSKI and KELLER (1990) and KIEFERNDORF and KELLER (1990). In pony stallion 1, on the 7<sup>th</sup> d.p.inf, leucopaenia with left shift developed, which may be the result of a confrontation of the body's cell defence with an antigen. The leucopaenia with left shift detected in the second pony stallion on the 240<sup>th</sup> d.p.inf. is not so much seen to be related to the *T. equigenitalis* infection as to the minor colic developing on the 237<sup>th</sup> and 238<sup>th</sup> d.p.inf.

The results of the haematological results underline the nature of CEM as a local infection of the genital mucous membranes and are consistent with the unimpaired clinical condition in both pony stallions throughout the study period, except for the minor colic condition in pony stallion 2.

The serological reactions with the SAT, HT and IFT techniques in both stallions under study should be considered as non-specific reactions.

The reactions with the IFT technique in both stallions up to a serum dilution factor of 1:10 should, according to the studies by TAINTURIER et al. (1981b), be assessed as negative.

The above-mentioned authors detected fluorescent antibodies in horses (mares and stallions) without any contact with *T. equigenitalis* up to a serum dilution factor of 1:10 and, after comparing these sera with sera from infected mares, established the titre limit for IFT at a titre factor of 1:20.

The fact that, as early as the day of infection, pony stallion 1 had reactive antibodies at a serum dilution factor of 1:10 with the IFT technique, indicates the accuracy of this limit. The fluorescent antibodies observed by TAINTURIER et al. (1981a) in the serum of two artificially infected pony stallions at 1:5 and 1:10 serum dilution factors were also considered as negative reactions.

The agglutination reactions observed with the SAT and HT techniques in the serum dilution factors should also be considered as negative in view of the international literature.

After serological studies, BENSON et al. (1978) and DAWSON et al. (1978) considered agglutination reactions with the SAT technique as positive from a serum dilution factor of 1:80. MACMILLAN and KIDD (1986) found similar agglutination reactions in horse sera, without the animals having been in known contact with CEM. 86% of the sera tested reacted, 19% of which at serum dilutions of 1:40 and over. These positive reactions could not be increased with the Coombs test and proved to be sensitive to 2-mercapto-ethanol. For these reasons, the positive agglutination reactions were attributed to non-specific IgM fixation.

Although positive antibody detection were obtained with the CFT technique by PITRE et al. (1979) and with the PHA technique by SCHLÜTER et al. (1990) in bacteriological positive stallions, no serum antibodies could be detected in the infection study conducted on both pony stallions, also using these serological detection methods.

### Post mortem study results

In the post mortem bacteriological and immunohistological studies, *T. equigenitalis* could not be detected in the regional lymph nodes in culture or using immunohistological methods. Since studies of this kind had not been previously conducted on stallions, it is only possible to refer to the results obtained by ACLAND et al. (1983), which detected the CEM bacterium in the lymph nodes belonging to the genital tract of the mare using fluorescent serological means and thus deduced the basis for the serological reaction of the mare.

The negative bacteriological studies of the kidney, pelvis of the kidney, ureter, epididymal body, vas deferens and bulbourethral glands could be substantiated by negative immunohistological results.

In the cultures developed from the bladder, testicles, epididymal heads, epididymal tails of both pony stallions and in the ampullae of the vas deferens of pony stallion 1 and the prostate gland and seminal vesicle of pony stallion 2, it was possible to detect isolated, soft Gram-negative bacillary or coccoid bacteria morphologically indicating *T. equigenitalis* after the production of Gram preparations of uncertain colony material. Since the further culture of these bacteria was not successful and, in immunohistological studies, positive results were only observed in the study of the testicles and seminal vesicle in pony stallion 2, it is only possible to make assumptions on the identity of the bacteria detected microscopically in the above-mentioned organs.

In addition to the possibility that the bacteria observed actually consisted of *Taylorella*, which had colonised in the organs with uncertain bacteriological results at a quantitatively very low level, in view of the literature, other bacterial species should be included in differential diagnosis considerations.

According to MACKINTOSH (1981), other microaerophilic Gram negative soft bacilli or coccoid bacteria, such as the *Haemophilus*, *Neisseria*, *Branhamella* and *Bordetella* species, should be taken into consideration in differential diagnosis. However, the above-mentioned types were previously only very rarely isolated from mares. In spite of its Gram negative staining action, the species found in genital tract mucous membranes of stallions, *Moraxella urethralis*, is well distinguished from *T. equigenitalis* due to the chain or diploid arrangement observed microscopically.

The positive post mortem pathogen detections in the entire urethra, the primary and secondary navicular fossae, glans and body of the penis show that, in the stallion, the external genitals are the first to be colonised. On the basis of the observations made in the pre- and post mortem bacteriological studies on the level of *Taylorella* colonisation, the primary and secondary navicular fossae are confirmed as the main colonisation site. The pathogen colonisation of the urethra, the external mucous membrane of the glans and the body of the penis takes place at a low quantitative level.

The microscopic detection of soft Gram negative bacilli and coccoid bacteria in the post mortem bacteriological study of the testicles and the isolated occurrence of specific fluorescence indicating fixation of rabbit immune serum and mAb TF III 11E5 antibodies on antigen-bearing structures in the lumen of the epididymal duct with the IFT technique imply, however, a low quantitative colonisation of the CEM pathogen in the testicles of pony stallion 2.

Since morphological modifications were observed by LAPAN (1990) after the in vitro effect of extracts of 56 *T. equigenitalis* strains on Vero and Y1 cells, cytotoxins formed by *T. equigenitalis* should be considered as the cause of the degenerative modifications on the germ epithelium.

The fluorescence observed in the immunohistological pathogen detection in the seminal vesicle at the same location when stimulated with green or ultraviolet light, which result from the fixation of antibodies of the rabbit immune serum and the mAb used, could be considered to confirm the suspected *T. equigenitalis* colonisation in the bacteriological study of this ancillary genital gland. The quantitative level of pathogen colonisation should be estimated as being very low, as in the testicles.

However, the analysis of the literature gives several indications of a possible colonisation of the ancillary genital glands by *T. equigenitalis*.

In studies on the virulence factors of the CEM pathogen by LAPAN (1990), it was possible to detect the ability of D-Mannose-resistant adhesion in 47.3% of the 56 *T. equigenitalis* strains under study. The adhesion ability detected, which is present in a large number of pathogenic bacteria colonising the mucous membrane, should be considered in this context as the basic condition for colonisation of the genital mucous membranes by *T. equigenitalis*.

A further indication is the anti-*T. equigenitalis* IgA activity detected by PARR (1990) with the ELISA technique in 98.8% of the pre-seminal fluid samples studied. This may result from the colonisation of the mucous membranes of the genital tract by *T. equigenitalis*.

The literature only contains results from post mortem bacteriological studies by PLATT et al. (1978) on a pony stallion sacrificed on the 22<sup>nd</sup> d.p.inf. The authors isolated the CEM bacterium in the distal urethra, the primary navicular fossa and the prepuce and concluded from their results, that ascendant *Taylorella* infection had not taken place.

In the anatomicopathological study of the organs removed from both pony stallions, no pathological modifications were observed on the external and internal sections of the genital tract or on the parts of the urinary tract. In the histopathological study of the organs of the above-mentioned organ systems in pony stallion 1 also, no indications of inflammatory modifications were observed.

These results are consistent with those of PLATT et al. (1978) on a pony stallion infected with *T. equigenitalis* and sacrificed on the 22<sup>nd</sup> d.p.inf. The authors only described mild non-specific testicular degeneration.

Unlike the results of the histopathological studies on pony stallion 1, in similar studies on the second pony stallion, divergent results were obtained in the testicles, epididymises, seminal vesicles, in the region of the urethra and the secondary navicular fossa. The isolated giant cells detected histopathologically in pony stallion 2 in the testicles should be viewed in relation to the decreased sperm production observed.

According to SEFFNER (1986) and SCHULZ (1991), giant cells develop in the event of sperm production disorders under the effect of various harmful substances as a result of meiosis disorders with the formation of hyperploid giant cells. Bacteria could represent one of these etiological factors.

Therefore, the partially sperm-free epididymal ducts should be considered as the consequence of lower sperm production.

The histopathological modifications detected in the second pony stallion in the seminal vesicles, subethelial in the region of the urethra and the secondary navicular fossae in the form of local lymphohistiocytic infiltrates in the interstitium of the glands indicate that the local immune system has encountered an antigen.

However, since *T. equigenitalis* could only be detected immunohistologically in the seminal vesicle and in the testicles, the probability that the CEM bacterium is responsible for the modifications in both these organs is slim.

### **Immune serum production in rabbits**

With the antigen used for immunisation in conjunction with the adjuvant applied, it was possible to induce a high serum antibody titre in all three immunised rabbits.

In the SAT specificity test, the undiluted pooled serum only agglutinated with *Actinobacillus equuli*. In spite of this, it was noted in the immunohistological study of the navicular fossae with the double labelling technique, that under FITC stimulation, both bacillary bacteria and cocci reacted, while under rhodamine stimulation, only bacilli produced fluorescence. This observation implies a non-specific reaction of the immune serum with the IFT technique with coccal bacteria. Since these bacteria were not detected by the mAb used but the mAb reacted with the use of culture material both with bacillary and coccoid forms of *T. equigenitalis*, it can be concluded that the cocci detected by the rabbit immune serum are coccoid forms of *T. equigenitalis*.

Various results are contained in the literature on cross-reactions of immune sera produced in rabbits against *T. equigenitalis*, which are discussed in relation to the specificity of the mAb.

### **Anti-*T. equigenitalis* mAb characterisation results**

The mAb directed against *T. equigenitalis* (except for TF II 8D4) detect, with the Western blot technique after separation in SDS-PAGE under non-reducing conditions, proteins with a relative molecular weight of 13, 22, 35, 47, 56, 70 and 117 kD of the *Taylorella* strain used for immunisation. 2 proteins in the region of 70 and 117 kD and 47 and 70 kD were detected by the mAb TF III 11B5 and TF III 3G3, respectively.

The results contained in the literature on immunogenic external membrane proteins are essentially based on studies using polyclonal rabbit immune sera and sera from infected horses.



LAPAN (1990) detected different immunogenic proteins in the molecular weight region of 14 to 130 kD in all of the 56 *T. equigenitalis* strains studied with the Western blot technique, with a polyclonal rabbit serum in SDS-PAGE under reducing conditions. However, since the author does not give any molecular weights of the individual proteins detected by the immune serum, it is only possible to compare with the individual results using estimations. Accordingly, 14, 22, 39, 43, 45, 48, 53, 57 and 130 kD proteins were detected by the rabbit serum.

SUGIMOTO et al. (1988) isolated the external membrane of *T. equigenitalis* and detected the main proteins in SDS-PAGE under non-reducing conditions with a molecular weight of 15, 27, 33, 41, 48 and 50 kD. The authors were able to detect using the Western blot technique a specific reaction of the 41 kD protein for *T. equigenitalis* infection, by comparing the reaction of mare sera, which were sampled before and after the *T. equigenitalis* infection.

Since native antigen material was used with the ELISA technique, the antibody-producing hybridoma cells were selected with respect to the ability of the murine antibodies to detect immunogenic *T. equigenitalis* surface structures. Using the mAb TF III 11E5 and TF I 10D5, it was succeeded in detecting differences of the antigen structure of different *T. equigenitalis* isolates for the first time. The mAb TF III 11E5 did not react with the *Taylorella* strain I/3 belonging to the DNA Fingerprint group I according to LAPAN (1990) with the ELISA technique, while all the other strains under study were only detected with insignificant quantitative differences in the extinction measured by the antibody. In addition, the *Taylorella* strain BW/26 was also not detected with the ELISA technique by the mAb TF I 10D5. The mAb TF I 10D5 detected the remaining *T. equigenitalis* isolates under test, but significant differences in the extinctions measured were recorded.

The other 6 mAb selected bonded with all the *Taylorella* strains under test, but some very marked differences were observed in the extinctions measured. Since equal quantities of antigen and antibody were used in the test system applied, these differences indicate both quantitative and qualitative differences in the composition of the epitopes detected by the mAb. The quantitative difference between the *T. equigenitalis* isolates could lie in a quantitatively different expression of certain epitopes, while qualitative differences would be attributable to a different affinity of the mAb for the epitopes of the individual *T. equigenitalis* strains under study detected.

In the literature available, no data is given on similar previous studies with mAb.

In comparative studies by LAPAN (1990), 56 *T. equigenitalis* strains were compared using SDS-PAGE with respect to their protein pattern. None of the strains studied showed qualitative or quantitative differences in the protein pattern.

In previous immunological studies on the antigen composition of the CEM pathogen, only polyclonal rabbit immune sera, which did not enable the detection of any immunological differences between the *Taylorella* strains under test with the SAT and co-agglutination techniques, were used (TAYLOR et al. 1978, KITZROW et al. 1979, DABERNAT et al. 1980b, MAZUROWA 1985, KAMADA et al. 1987, SELBITZ et al. 1987).

With the IFT technique, TER LAAK and WAGENAARS (1990) observed no serological differences in any of the 20 *T. equigenitalis* strains under study using a goat immune serum.

CORBEL and BREWER (1982) detected 11 precipitating antigens with protein characteristics with polyclonal rabbit immune serum on ultrasound and phenol extracts of 5 *T. equigenitalis* strains with the immunoelectrophoresis technique, with no detectable differences between the isolates used.

LAPAN (1990) was also unsuccessful in detecting differences in the antigenic structure of 56 isolates with an immune serum produced in rabbits with the Immunoblot technique.

On the basis of the ELISA reaction of the mAb with the representatives of the genome groups detected according to LAPAN (1990), no relationship between the genome group and mAb reaction has been previously demonstrated. The question in relation to the extent to which the different reactions of the selected mAb with the *T. equigenitalis* isolates under test could be attributed to the division of *T. equigenitalis* strains in different antigen groups remains open. In order to test the possibility of the use of the mAb as an epidemiological marker, it is necessary to test their reaction with a larger number of *T. equigenitalis* strains.

The non-existent reaction of the mAb TF II 8D4 with the Immunoblot technique may have various causes, which must be determined in further studies. One of the possible causes would be that this mAb detects a discontinuous epitope, i.e. an epitope on the cell membrane surface, which loses its antigenic properties after the denaturing treatment of the bacterial cells with SDS due to the destruction of the tertiary structure. A further possibility would be that this antibody is directed against lipopolysaccharides (LPS) which are strongly represented in the cell walls of Gram negative bacteria.

Studies by CORBEL and BREWER (1982) and SIGOMOTO et al. (1988) demonstrated that LPS are involved in the immune reaction produced by *T. equigenitalis*. CORBEL and

BREWER (1982) detected an LPS protein antigen and a polysaccharide antigen with a rabbit serum. SUGIMOTO et al. (1988) detected an immunogenic LPS located in the external membrane and also an immunogenic non-LPS-component with the cross-immunoelectrophoresis technique with sera from infected mares, corresponding, in the opinion of the authors, to the components detected by CORBEL and BREWER (1982).

In the clarification of possible cross-reactions of the 8 different mAb selected with representatives of various bacterial species, no specific immunological reactions occurred with the ELISA technique, whereby it is impossible to make a statement on the antigenic properties of *T. equigenitalis* with *Streptococcus equi* or *Streptococcus zooepidemicus* due to the non-specific fixation of the POD conjugate used by the latter bacterial species.

In the literature, various authors repeatedly report on cross-reactions of immune sera produced against *T. equigenitalis* with a wide variety of bacteria, or it is concluded, due to the immunological reactions of human and bovine sera with *T. equigenitalis*, that the CEM pathogen and other bacteria present in the human or bovine genital tract have common antigenic properties.

TAYLOR et al. (1978) detected cross-reactions with *Brucella abortus*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus influenzae*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* with a rabbit immune serum with the tube agglutination technique at a serum dilution factor of 1:10 to 1:20. The serum also reacted with the RAT technique undiluted with *Moraxella osloensis* (NCTC 10465) and *Actinobacillus* species (NCTC 10803) or up to a 1:2 dilution with *Haemophilus influenzae* (NCTC 11135), *Neisseria elongata* subspecies *glycolytica* (NCTC 11050) and *Pasteurella pneumotropica* (NCTC 10609). NEILL et al. (1984) described agglutinations of an undiluted rabbit immune serum with *Actinobacillus* species (NCTC 10803) and *Acinetobacter lwoffii*, a bacterium, which, according to VAISSAIRE et al. (1987) belongs to the normal saprophytic flora of the stallion.

After the adsorption of antibodies from a rabbit hyperimmune serum by the protein A positive staphylococcus strain Cowan I, KITZROW et al. (1979) observed a weak reaction with *Haemophilus suis* with the co-agglutination technique.

On the other hand, DABERNAT et al. (1980b), TAINTURIER ET AL. (1981c), MAZUROWA (1985) and SELBITZ et al. (1987) did not detect any cross-reactions of the immune sera they produced in rabbits with other bacterial species.

The mAb reaction with the IFT technique showed the ability of all mAb to react with *T. equigenitalis* at different intensities with this detection method. The mAb TF II 8D4 and TF III 11B5 have emerged as being particularly suitable for use in IFT.

The establishment of hybridoma cells, producing mAb directed against *Taylorella equigenitalis*, opens up new paths in research on the epidemiology of this equine genital disease. Since the mAb TF II 8D4 and TF III 11B5 detect all the *Taylorella* strains under test with the ELISA technique, did not show any cross-reactions with previously tested bacterial species and these antibodies are able to react with the IFT technique, it is possible to establish a rapid test based on IFT to study smears of genital swabs and genital secretions of stallions and mares for *T. equigenitalis*. In addition, these mAb could be used with the IFT technique to identify uncertain culture material which, as the infection study conducted also demonstrated, results in difficult diagnosis in the event of asymptomatic *T. equigenitalis* carriers. For this, the identification of the antigenic determinants of the CEM bacterium detected by the mAb TF II 8D4 would be required.

TER LAAK et al. (1989) and TER LAAK and WAAGENAARS (1990) already used a hyperimmune serum developed in goats to identify *T. equigenitalis* cultures, which self-agglutinated under specific culture conditions. This methods to identify uncertain bacteria could be more specific with the use of mAb.

In order to obtain a more accurate profile of the specificity of mAb produced within the scope of this study, further comparative studies with bacterial species that have not been tested to date, which were described as cross-reactive in the literature, should be conducted. In this context, the study of possible common antigenic properties of *T. equigenitalis* with bacteria of the physiological genital flora of stallions and mares according to their bacteriological culture would be of interest.

Furthermore, studies on common antigenic properties of *T. equigenitalis* with pathogenic and opportunistic bacterial species colonising the male genital tract, which are considered as the cause of the reaction of *T. equigenitalis* with human serum, would be possible.

## 6. Conclusions

In infection studies with Shetland ponies, it was possible to demonstrate the sexual transmissibility of *Taylorella equigenitalis*, wherein the CEM bacterium was transmitted from a pony mare to a pony stallion and from a pony stallion to a pony mare.

Since, in the bacteriological studies of genital swabs, it was not possible to determine any site in the external stallion genitals, from which the pathogen can be reisolated in a reproducible manner, in order to obtain a high accuracy of detection in the stallion, swabs from the body of the penis, the primary and secondary navicular fossae, the urethra, pre-seminal fluid and ejaculum should be studied.

However, since, in all the bacteriological studies conducted in 2 pony stallions, *T. equigenitalis* was most frequently isolated from the navicular fossa swabs and in the post mortem bacteriological studies of the urinary and genital organs of both pony stallions and in the immunohistological study of organ sections from pony stallion 2, the highest *Taylorella* concentration was found in the primary and secondary navicular fossae of the stallions, the primary and secondary navicular fossae can be considered as the main *Taylorella equigenitalis* colonisation site in the male genital tract, equivalent to the clitoral sinus in the mare.

The sudden positive pathogen detections in pony stallion 2 after the intensive semen elimination training give grounds for the assumption that infected mating stallions, which gave negative results in stud hygiene studies before the beginning of the mating season, may suddenly transmit the pathogen massively as a result of sexual activity in the mating season.

The time required for the primary isolation of *T. equigenitalis* which varies between 2 and 9 days according to colony size in this infection study, which was associated with a further few days for subculture and to ensure the diagnosis, results in a clear pathogen detection time.

Since in the stallion, it is first of all necessary to account for the development of the slow-growth small colony type in asymptomatic *T. equigenitalis* carriers, blood agar dishes should be incubated for at least 10 days to detect *Taylorella* in suspect stallions to avoid false negative results.

Using the immunohistological study of organ and tissue sections from pony stallion 2, it was possible to confirm the suspicion expressed in the post mortem bacteriological study with respect to the *T. equigenitalis* colonisation in the testicles and semen vesicles. Since this antigen detection method confirmed the assumption expressed repeatedly in the literature on the possibility of *T. equigenitalis* colonisation in the internal genital organs of the stallion for the first time, the question as to whether this colonisation of the CEM pathogen generally took place in the stallion needs to be answered.

Since no specific antibodies could be detected using the SAT, HT, CFT, PHA and IFT techniques in either of the infected pony stallions during the course of the infection study, serological studies on *T. equigenitalis* antibodies should be considered unsuitable to detect *Taylorella* infection in stallions.

The results of the haematological studies in both infected pony stallions underline the local and asymptomatic nature of *T. equigenitalis* infection in the stallion.

This statement should also be taken into consideration in relation to the unclear results of the anatomicopathological studies conducted post mortem in both horses.

The lymphohistiocytic infiltrates that could be detected interstitially in the seminal vesicle, and subepithelially in the urethra and secondary navicular fossa in the histopathological study of the genitals and the decreased sperm production observed in the testicles could be considered as a result of the effect of *Taylorella equigenitalis* or the cytotoxins produced by this species. With the sperm production disorder observed, fertility disorders in stallions as a result of *Taylorella* infection should be studied further.

However, since the histopathological studies of the genital organs of both pony stallions did not give a uniform picture, further studies are required with respect to the effect of the CEM pathogen on the genital organs of stallions.

The fact that the mAb TF II 8D4 and TF III 11B5 detect all *Taylorella* isolates tested to date with the ELISA technique and also react with the IFT technique, the use of these two mAb in a rapid IFT test to study smears of genital swabs and genital secretions and suspect colony material for *Taylorella equigenitalis* would appear to be reasonable.

The possibility to use the mAb as an epidemiological marker to divide *T. equigenitalis* isolates into antigen groups on the basis of the different reaction patterns with the mAb should be verified by testing the reaction of the selected mAb with a larger number of *T. equigenitalis* strains.

Using the mAb, it was not possible to detect any common antigenic determinants of 12 different *T. equigenitalis* isolates and 21 other bacterial species with the ELISA technique. This result indicates the specificity of the mAb directed against *T. equigenitalis*. However, before the recommended mAb are used with the IFT technique to detect *T. equigenitalis*, further studies on cross-reactions with bacteria in the physiological genital flora of stallions and mares should be conducted.

## 7. Summary

The purpose of this work was to study the progression and effects of *T. equigenitalis* infection and the colonisation sites of the CEM bacterium in the stallion.

To resolve this question, intra vitam bacteriological, clinical, serological and haematological studies were conducted on two artificially infected Shetland pony stallions. A post mortem anatomicopathological and histopathological study of the urinary and genital organs and the regional lymph nodes was conducted with respect to modifications induced by *T. equigenitalis*, along with pathogen detection in culture. The organs removed from one stallion also underwent immunohistological pathogen detection using a hyperimmune serum produced in rabbits and monoclonal antibodies directed against *T. equigenitalis*. The hyperimmune serum and the monoclonal antibodies were also tested with respect to their specificity using 12 *T. equigenitalis* isolates and 23 other bacterial species.

In the infection study, no clinical symptoms related to *T. equigenitalis* occurred. In the serological studies, no *T. equigenitalis*-specific antibodies were detected in the SAT, HT, PHA, CFT and IFT. Similarly, the results of the haematological studies did not allow any conclusions as to the confrontation of the infected pony's body's cell defence system with the CEM bacterium. In the bacteriological studies, the primary and secondary navicular fossae were established as the main *T. equigenitalis* colonisation site in the stallion.

In the immunohistological study, *T. equigenitalis* was detected in the seminal vesicles and testicles of a pony stallion with the IFT double labelling technique.

With monoclonal antibodies directed against *T. equigenitalis*, it was possible to detect, for the first time, differences in the antigenic structure of representatives of the *T. equigenitalis* species and to open up new paths in research on the epidemiology of this equine genital disease. The monoclonal antibodies make it possible to speed up CEM diagnosis and increase the level of accuracy of detection.





C'est votre traduction !

Administrative • Administrative

Commercial • Marketing

## DECLARATION


I, Mrs. LERMER, of A.R.T International 26 rue Carnot – 95410 Groslay – France

do hereby declare that I am conversant with the English and German languages and am a competent translator thereof.

I declare further that the following is a true and accurate translation into English of the Thesis referenced "Untersuchungen zum Erreger-Wirt-Verhältnis der Taylorella-equi-genitalis-Infektion des Hengstes und zur Entwicklung diagnostisch einsetzbarer monoklonaler Antikörper" from part "4.2. Ergebnisse" to part "7. Zusammenfassung".

Signed this 19th day of December 2002

Translator:



B.P. 18  
95410 GROSLAY  
Tél : 01.39.34.70.70  
Fax : 01.39.34.70.77

Untersuchungen zum Erreger-Wirt-Verhältnis der Taylorella-equigenitalis-Infektion des Hengstes und zur Entwicklung diagnostisch einsetzbarer monoklonaler Antikörper

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr.med.vet.

der Veterinärmedizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von Diplomveterinärmediziner Uwe Friedrich  
geboren am 14.05.1963 in Leipzig

angefertigt am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig und am Institut für Virologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Beschluß über die Verleihung des Doktorgrades  
vom: 17.12.1993

Universität Leipzig  
Universitätsbibliothek  
Zweigstelle Veterinärmedizin  
Simmelweisstraße 4  
04103 Leipzig

1994-132

DICS 634

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Krüger  
Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Ludwig  
Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin  
Institut für Virologie
3. Gutachter: Prof. Dr. med. vet. habil. K. Elze  
Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

## Inhaltsverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
2.	Literaturübersicht .....	2
2.1.	Vorkommen der CEM.....	2
2.1.2.	Wirtsspektrum.....	4
2.1.3.	Epidemiologische Rolle des Hengstes .....	5
2.1.4.	Bedeutung der physiologischen Genitalflora des Hengstes.....	7
2.2.	Erregercharakterisierung.....	9
2.2.1.	Morphologie.....	9
2.2.2.	Tenazität .....	12
2.2.3.	Biochemische Eigenschaften .....	12
2.2.4.	Virulenzfaktoren.....	14
2.2.5.	Immunologie .....	16
2.2.6.	Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika.....	18
2.3.	Klinik .....	20
2.4.	Pathologie .....	21
2.5.	Prophylaxe und Therapie .....	21
2.6.	Labordiagnostischer Nachweis von <i>T. equigenitalis</i> .....	24
2.6.1.	Probenentnahme und Transport .....	24
2.6.2.	Primärisolation des Erregers .....	26
2.6.3.	Differenzierung von <i>T. equigenitalis</i> .....	28
2.6.4.	Serologische Untersuchungsmethoden .....	30
2.6.5.	Diagnostische Zusatzmethoden.....	31
3.	Problemstellung.....	32
4.	Eigene Untersuchungen .....	33
4.1.	Material und Methoden .....	33
4.1.1.	Experimentelle Infektion von Ponyhengsten.....	33
4.1.1.1.	Versuchstiere und Probenentnahme .....	33
4.1.1.2.	Infektionsversuch .....	34
4.1.1.3.	Bakteriologische Untersuchungen.....	35
4.1.1.4.	Hämatologische Untersuchungen.....	36
4.1.1.5.	Serologische Untersuchungen.....	36
4.1.1.6.	Pathologisch-anatomische und histologische Untersuchungen .....	38
4.1.1.7.	Immunhistologischer Erregernachweis.....	38
4.1.2.	Herstellung von Antiseren im Kaninchen.....	39

4.1.3.	Herstellung monoklonaler Antikörper .....	40
4.1.3.1.	Antigenpräparation .....	40
4.1.3.2.	Proteinbestimmung .....	41
4.1.3.3.	Immunisierung von Balb/c-Mäusen .....	41
4.1.3.4.	ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen <i>T. equigenitalis</i> ...	43
4.1.3.4.1.	Lösungen .....	44
4.1.3.4.2.	ELISA-Durchführung .....	44
4.1.3.5.	Herstellung von Hybridomakulturen .....	44
4.1.3.5.1.	Lösungen und Medien .....	44
4.1.3.5.2.	Myelomzellen .....	45
4.1.3.5.3.	Splenektomie und Aufbereitung der Milzzellen .....	45
4.1.3.5.4.	Aufarbeitung der Myelomzellen .....	46
4.1.3.5.5.	Fusion von Myelom- und Milzzellen .....	46
4.1.3.5.6.	Kultivierung von Hybridomakulturen .....	46
4.1.3.5.7.	Testen auf die Produktion spezifischer Antikörper .....	47
4.1.3.5.8.	Klonieren .....	47
4.1.3.5.9.	Einfrieren von Hybridomzellen .....	48
4.1.3.5.10.	Produktion von mAK .....	48
4.1.3.6.	Methoden zur Charakterisierung monoklonaler Antikörper .....	48
4.1.3.6.1.	Subklassenbestimmung .....	48
4.1.3.6.2.	Enzym-Linked-Immuno-Assay (ELISA) .....	49
4.1.3.6.3.	Indirekter Immunofluoreszenztest .....	50
4.1.3.6.4.	Immunoblot .....	50
4.1.3.6.4.1.	Chemikalien und Lösungen .....	50
4.1.3.6.4.2.	SDS-PAGE .....	51
4.1.3.6.4.4.	Immunoblot .....	52
4.1.3.6.4.5.	Bestimmung der Molekulargewichte .....	52
4.2.	Ergebnisse .....	53
4.2.1.	Ergebnisse des bakteriologischen Erregernachweises .....	53
4.2.2.	Klinischer Verlauf der Taylorelleninfektion .....	57
4.2.3.	Ergebnisse des serologischen Untersuchungen .....	58
4.2.4.	Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen .....	60
4.2.5.	Postmortaler kultureller Nachweis von <i>T. equigenitalis</i> .....	62
4.2.6.	Ergebnisse der pathologischen Untersuchungen .....	64
4.2.7.	Immunhistologischer Nachweis von <i>T. equigenitalis</i> .....	67
4.2.8.	Immunserumherstellung im Kaninchen .....	68
4.2.9.	Charakterisierung monoklonaler Antikörper .....	69

5.	Diskussion der Ergebnisse .....	73
6.	Schlußfolgerung. ....	87
7.	Zusammenfassung .....	90
Tabellenanhang		
Literaturverzeichnis		
Selbständigkeitserklärung		
Lebenslauf		
Danksagung		

## Bibliographische Beschreibung :

Friedrich, Uwe

Untersuchungen zum Erreger-Wirt-Verhältnis der Taylorella-equigenitalis-Infektion des Hengstes und zur Entwicklung diagnostisch einsetzbarer monoklonaler Antikörper

Universität Leipzig, Diss.,  
120 S., 217 Lit., 19 Abb., 15 Tab.

### Referat:

An zwei mit Taylorella equigenitalis infizierten Shetlandponyhengsten wurden der Verlauf der Erregerausscheidung, die lokale Ansiedlung des Erregers im äusseren Genitaltrakt sowie die hämatologische und humorale Reaktion des Organismus untersucht. Postmortal erfolgten pathologisch-anatomische, pathohistologische, bakteriologische und immunhistologische Untersuchungen der Organe des Harn- und Geschlechtsapparates.

Der Herstellung von gegen Taylorella equigenitalis gerichteten monoklonalen Antikörpern schloß sich deren Charakterisierung und Untersuchung hinsichtlich ihrer Spezifität an.

Die Taylorella-equigenitalis-Infektion ruft beim Hengst weder klinischen Veränderungen noch infektionsbedingte Abweichungen im roten und weißen Blutbild hervor. Spezifische gegen den Erreger gerichtete humorale Antikörper treten beim Hengst im Verlaufe der Infektion nicht auf. Als Hauptkolonisationsort beim Hengst wurden die primäre und die sekundären Eichelgruben ermittelt. Im Verlaufe der Erregerpersistenz treten Veränderungen hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit auf. Postmortale pathohistologische, immunhistologische und bakteriologische Untersuchungen weisen auf eine Erregeransiedlung in Hoden und Samenblasen hin. Die entwickelten monoklonalen Antikörper reagierten spezifisch mit Taylorella equigenitalis und ließen erstmalig Unterschiede in der Antigenstruktur des CEM-Erregers erkennen. Sie zeigen keine Kreuzreaktionen mit anderen Bakterien-spezies.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
BAS	Basophile Granulozyten
BDV	Borna Disease Virus
BSA	Bovines Serumalbumin
CEM	Contagious equine Metritis
cFA	Komplettes Freudsches Adjuvans
d.p.inf.	Tag post infectionem
d.p.vacc.	Tag post vaccinationem
ELISA	Enzym-Linked-Immunosorbent-Essay
EOS	Eosinophile Granulozyten
Ery	Erythrozyten
gk	gekerbte neutrophile Granulozyten
grLy	große Lymphozyten
HT	Hitzetest
HK	Hämatokrit
Jgdl	jugendliche neutrophile Granulozyten
IFT	indirekter Immunfluoreszenztest
IDT	Immundiffusionstest
KB	Künstliche Besamung
KBR	Komplementbindungsreaktion
klLy	kleine Lymphozyten
Leu	Leukozyten
Lnn	Lymphonodi
mAK	monoklonaler Antikörper
Mon	Monozyten
NC	Nitrozellulose
Myel	Myelozyten
OSA	Objektträgerschnellagglutination
PEG	Polyethylenglykoll
PHA	passive Hämagglutination
POD	Peroxidase
sgm	segmentkernige neutrophile Granulozyten
SLA	Serumlangsamagglutination
T.	Taylorella
Tab.	Tabelle
ugk	ungekerbte neutrophile Granulozyten
U/min	Umdrehungen pro Minute



## 1. Einleitung

Im Jahre 1976 wurde das erste Mal über eine bislang unbekannte infektiöse Genitalerkrankung bei Vollblutpferden in Irland berichtet, als deren Erreger jedoch zunächst irrtümlicherweise *Proteus mirabilis* angesehen wurde (O'DRISCOLL 1977). Bereits im darauffolgenden Jahr traten in englischen Vollblutzuchten weitere Ausbrüche dieser neuartigen venerischen Erkrankung auf, in deren Verlauf durch PLATT et al. (1977) das ursächliche Agens, *Taylorella equigenitalis*, isoliert werden konnte.

TAYLOR et al. (1978) schlugen auf der Grundlage der von ihnen durchgeführten morphologischen, biochemischen, serologischen und genetischen Untersuchungen vor, das gramnegative, unbewegliche kokkoide Stäbchen unter dem Namen *Haemophilus equigenitalis* der Gattung *Haemophilus* als neue Spezies zuzuordnen.

Da aber dem Erreger der CEM wesentliche Merkmale des Genus *Haemophilus* fehlen (Kohlenhydratfermentation, X- und V-Faktorabhängigkeit, Nitratreduktion), wurde dieser Vorschlag nie offiziell bestätigt (ZINNEMANN 1980, ANONYM 1982b).

SUGIMOTO et al. (1982, 1983a,b) demonstrierten in gaschromatographischen Analysen, in der Ermittlung des Guanin-Cytosin-Verhältnisses der DNA und mit der DNA-DNA-Hybridisationstechnik das Fehlen jeglicher verwandtschaftlicher Beziehungen von *T. equigenitalis* zu den Gattungen *Haemophilus*, *Brucella*, *Bordetella*, *Moraxella* und *Pasteurella*.

Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen schlußfolgernd schlugen SUGIMOTO et al. (1983a) die Schaffung eines neuen Genus *Taylorella* gen.nov. vor, das mit *Taylorella equigenitalis* comb. nov. nur eine Spezies enthält.

Im Jahre 1984 wurde der Erreger der CEM der Anregung von SUGIMOTO et al. (1983a) folgend mit der derzeit gültigen taxonomischen Bezeichnung *Taylorella equigenitalis* versehen (ANONYM 1984, MOORE et al. 1985).

Die in den Jahren nach 1977 weltweit in Pferdezuchten aufgetretene spezifische Genitalerkrankung der Equiden wurde 1983 auf der 21. Generalversammlung des O.I.E. in die Liste B der meldepflichtigen Tierseuchen aufgenommen und ist in der Bundesrepublik Deutschland eine meldepflichtige Tierseuche (ANONYM 1983, MÜLLER und KÜHLER 1985).

Diese nach BLAHA (1990) zu den faktorenbeeinflussten bakteriellen Infektionskrankheiten gehörende lokale Infektion des Genitalapparates des Pferdes verursachte in der englischen Vollblutzucht im ersten Jahr des Erregernachweises

einen auf 30 Mio. US-Dollar geschätzten finanziellen Verlust, der u.a. auch aus der in Folge des Ausbruches um 40 % gesunkenen Fertilitätsrate resultierte (DAY et al. 1979, KNOWLES et al. 1978).

Obwohl sich inzwischen gezeigt hat, daß bei Einhaltung anerkannter Regeln der Diagnostik, Therapie und Prophylaxe größere Schäden in der Praxis vermieden werden können, muß immer mit dem Auftreten möglicher Taylorella-equigenitalis-Infektionen gerechnet werden, wie Erregernachweise in den vergangenen Jahren in Baden-Württemberg und 1992 in Thüringen zeigten (ANONYM 1991, BOCKLISCH, persönl. Mitt. 1992).

## **2. Literaturübersicht**

### **2.1. Vorkommen der CEM**

O'DRISCOLL (1977) erwähnt zum ersten Mal 1976 eine bei irischen Vollblutstuten aufgetretene hochinfektiöse und hochkontagiöse Genitalinfektion, als deren Ursache er *Proteus mirabilis* ermittelt.

Im Frühjahr 1977 wurde eine in 29 Vollblutgestüten des Zuchtgebietes um Newmarket, England, klinisch und epidemiologisch gleichartig verlaufende Genitalinfektion, in deren Verlauf 200 Stuten und 23 Hengste als Keimträger ermittelt werden konnten, beobachtet (CROWHURST 1977, POWELL 1978, SIMONS und GIBSON 1978).

PLATT et al. (1977) gelang es im Juli 1977 erstmals, den Erreger dieser neuartigen venerischen Erkrankung des Pferdes unter bis dahin in der zuchthygienischen Überwachung der Pferdezuchten unüblichen mikroaerophilen Kultivierungsbedingungen zu isolieren.

Obwohl der Erreger der CEM anschließend auch in Irland durch TIMONEY et al. (1977) und Frankreich durch PITRE et al. (1979) nachgewiesen wurde, traten in den europäischen Ländern zunächst keine Beschränkungen für den Ex- und Import von Zuchtpferden in Kraft, ein Umstand, der die Ausbreitung dieser Infektionskrankheit insbesondere in der Vollblutpferdezucht zweifelsohne begünstigte (LUCIANO COUSINET 1981). Dagegen reagierten die USA, Kanada, Australien und Neuseeland mit strikten Importverboten für zweijährige und ältere Pferde aus Irland, England und Frankreich, welches jedoch 1981 durch Ausnahmeregelungen (z.B. Klitorissinusektomie bei Stuten) nach der Intervention durch europäische Zuchtverbände und Veterinärbehörden gelockert wurde (POWELL 1978, 1981, EAGLESOM und GARCIA 1979, TANTURIER et al. 1979, RICKETTS und WINGFIELD-DIGBY 1981, LÜNING et al. 1983).

Zunächst wurde der intensiv betriebene internationale Zuchttierhandel als die Hauptursache für den plötzlichen Nachweis von *Taylorella equigenitalis* in den Pferdepopulationen auf allen Kontinenten angesehen (TIMONEY und POWELL 1988).

Doch schon ECKSTEIN et al. (1983) wiesen darauf hin, daß es sich bei den in der BRD isolierten Keime um bodenständige Erreger handelte. Die Autoren stufen *T. equigenitalis* als fakultativ pathogenen Keim ein, der bereits lange Zeit vor seiner Entdeckung mit dem Genitaltrakt des Pferdes vergesellschaftet war.

Epidemiologische Untersuchungen nach dem Nachweis des Erregers in der brandenburgischen Landeszucht untermauerten die Vermutung, daß neben der Einschleppung von *T. equigenitalis* durch den Zuchttierhandel auch die bisher unerkannte Persistenz des kausalen Agens in der Landeszucht für den plötzlichen Nachweis von *T. equigenitalis* in Frage kommt (SCHNELLER 1991).

Einer Studie von TIMONEY und POWELL (1982) zufolge, die die Infektion eines Hengstfohlens in Großbritannien auf das Jahr 1974, also 3 Jahre vor der Erstisolation von *T. equigenitalis*, zurückdatierten, ist anzunehmen, daß der Erreger der CEM bereits lange Zeit vor den ersten Beschreibungen dieser Genitalerkrankung in der Pferdepopulation persistierte und zu Fruchtbarkeitsstörungen führte.

Im Zeitraum von 1978 bis 1982 wurden in der Bundesrepublik Deutschland nahezu 5000 Proben auf *T. equigenitalis* untersucht, aus denen lediglich 1,2 % der untersuchten Tiere (61 Stuten und 8 Hengste) als Keimträger ermittelt werden konnten (ECKSTEIN et al. 1983).

Ein ähnlich niedriger Keimträgeranteil existiert nach PAAR (1989) in der westdeutschen Hengstpopulation. In der bakteriologischen Untersuchung von Vorsekretproben von 165 Hengsten vor Beginn der Deckseason 1988 wurden 2 Tiere als Träger *T. equigenitalis* ermittelt.

Eine deutlich höhere Nachweisrate von *T. equigenitalis* bei Hengsten wurde dagegen durch FLATSCHER et al. (1984) mit 18,1 % positiven Erregernachweisen bei 298 untersuchten Tieren zwischen 1979 und 1983 erzielt.

Nach Erhebungen durch FRERKING et al. (1988) liegt der Anteil der Keimträger an der norddeutschen Warmblutstutenpopulation ebenfalls zwischen 1 bis 2 %, wobei diese Angaben nur Stuten mit Endometritisvorbericht umfassen. Da jedoch auch klinisch unauffällige Stuten Träger von *T. equigenitalis* sein können, rechnen die Autoren mit einer etwas höheren Dunkelziffer.

Die Tabelle 1 gibt Übersicht über den zeitlichen, weltweiten Nachweis der CEM.

Tab. 1: Nachweis von *Taylorella equigenitalis*

Nachweisjahr	Land	Autoren
1977	England	CROWHURST (1977)
	Irland	TIMONEY et al. (1977)
	Frankreich	PITRE et al. (1979)
1978	USA	SWERCZEK (1978a,b)
	BRD	BLOBEL et al. (1978)
	Australien	HUGHES et al. (1978)
	Belgien	DEKEYSER et al. (1987)
1980	Italien	CODAZZA et al. (1980)
	Japan	SUGIMOTO et al. (1980)
	Brasilien	BREWER et al. (1980)
	Österreich	LORIN et al. (1984)
1981	Jugoslawien	MEHLE et al. (1984)
1982	Schweden	ENGVALL et al. (1983)
	Dänemark	BREWER (1983)
1983	Thailand	ANIMAL HEALTH YEARBOOK 1983
1984	CSSR	MAZUROVA (1984)
	Kuwait	ANIMAL HEALTH YEARBOOK 1984
1985	Norwegen	ANIMAL HEALTH YEARBOOK 1985
	DDR	SCHNELLER (1991)
	Libanon	ANIMAL HEALTH YEARBOOK 1985
	Zaire	ANIMAL HEALTH YEARBOOK 1985
1987	Niederlande	TER LAAK et al. (1989)
1988	Schweiz	ANIMAL HEALTH YEARBOOK 1988
1990	Bolivien	ANIMAL HEALTH YEARBOOK 1990
	Guinea-Bissau	ANIMAL HEALTH YEARBOOK 1990

### 2.1.2. Wirtsspektrum

Die kontagiöse equine Metritis ist eine wechselseitig übertragbare Infektionserkrankung des Pferdes (DIETZ und WIESNER 1982).

Der Erreger, *Taylorella equigenitalis*, konnte bisher aus dem Genitaltrakt von Vollblütern, Halbblütern, Trabern, Haflingern, Vertretern verschiedener Warmblut-

rassen und Ponys isoliert werden (PLATT et al. 1977, TIMONEY et al. 1977, FALES et al. 1979, MUMME und AHLWEDE 1979, LIGNIERES 1980, O'BRIEN 1982, TER LAAK et al. 1989).

Ausgehend von Restriktionsenzymanalysen des Genoms von *Taylorella equigenitalis*-Isolaten aus verschiedenen Kontinenten und von unterschiedlichen Pferderassen schlossen BLEUMINK-LUYM et al. (1990) dabei eine wechselseitige Übertragung zwischen der Vollblut- und der Nichtvollblutpopulation aus.

In experimentellen Untersuchungen an artifiziell infizierten Eselstuten konnten die gleichen klinischen Symptome wie bei Pferden sowie ein ähnliches Verhalten des Erregers hinsichtlich seiner Persistenz registriert werden (TIMONEY et al. 1979a, TIMONEY et al. 1985a). Obwohl Hinweise über natürliche Infektionen beim Esel bisher fehlen, wird diese Spezies als potentielle Quelle von Infektionen auf Gestüten bei gemeinsamer Haltung angesehen.

Aus negativ verlaufenen bakteriologischen Reisolationsversuchen nach der Inokulation von *T. equigenitalis* bei einer Färse, Jungsau und einem weiblichen Jungschaaf wurde auf eine hohe Wirtsspezifität des Erregers geschlossen (TIMONEY et al. 1978f).

In Untersuchungen an kleinen Labortieren führte die intrauterine Inokulation von *T. equigenitalis* beim Kaninchen, Meerschweinchen und weißen Mäusen zu einer kurzzeitigen Erregerpersistenz ohne klinische Symptome (TIMONEY et al. 1978a).

Ein murines Infektionsmodell, das u.a. für die in-vivo-Untersuchung der Effektivität von Chemotherapeutika geeignet ist, entwickelten ARKO und WONG (1980) unter Verwendung subkutan implantierter poröser Polyethylenkammern, in denen Taylorellen über 30 Tage persistierten.

Bei Infektionsversuchen an Katzen durch TIMONEY et al. (1984) konnten bei 50 % der Versuchstiere Taylorellen bis zu 16 d.p.inf. reisoliert werden.

### **2.1.3. Epidemiologische Rolle des Hengstes**

Der Hengst muß als wichtigster Überträger von *T. equigenitalis* angesehen werden, da er, ohne selbst Krankheitssymptome zu zeigen, den Erreger während des Deckaktes von unerkannten Trägerstuten aufnehmen und im Verlauf der Decksaison weitergeben kann (ANONYM 1979b, ANONYM 1981, DAVID et al. 1977, SCHLÜTER et al. 1991).

Dabei muß aber der Deckakt mit einem infizierten Deckpartner nicht zwangsläufig zur Übertragung von *T. equigenitalis* von der Stute auf den Hengst bzw. vom Hengst auf die Stute führen (CROWHURST et al. 1979, FLATSCHER et al. 1984, SCHLÜTER et al. 1991).

Die Vermutung, daß eine Übertragung des Erregers auf das Fohlen bereits im Uterus, während oder nach der Geburt stattfinden und dem eine mehrjährige Keimpersistenz folgen kann, wurde durch epidemiologische Untersuchungen von TIMONEY und POWELL (1982) bzw. TIMONEY und STRICKLAND (1982) bestätigt. Sie wiesen darauf hin, daß dabei insbesondere Hengstfohlen auf Grund der anatomischen Gegebenheiten einem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt sind. Die Infektion der Fohlen kann dabei durch den Kontakt der Urethraöffnung mit den Fruchthüllen oder dem Klitorisgebiet der Mutterstute beim Passieren des Geburtskanales erfolgen. Infektiöser Vaginalausfluß der Mutterstute stellt besonders für das männliche Fohlen eine Gefahr dar, da diese die Angewohnheit haben, den Penis teilweise auszuschachten, so daß dieser mit kontaminiertem Untergrund in Berührung kommen kann. Die Untersuchungen von TIMONEY und POWELL (1982) weisen auf ein Erregerträgetum von bis zu 5 Jahren nach einer im Fohlenalter erfolgten Infektion hin.

SIMPSON und EATON-EVANS (1978) berichten über die Isolation von *T. equigenitalis* vom Penis eines Fohlens am 36. und 48. Lebenstag.

Weiterhin wurde die Möglichkeit der Übertragung des Erregers über Probierhengste, die infolge Kontakt ihres Nüstern mit der Perinealregion von infizierten Stuten zur Verbreitung von *T. equigenitalis* beitragen können, diskutiert (DINGLE 1977, BONJOUR und JOUBERT 1980). Die Rolle des Probierhengstes ist nach fehlgeschlagenen Übertragungsversuchen durch TAINTURIER et al. (1981a) jedoch zu vernachlässigen. Hier gelang es nicht, den Erreger von den artifiziell kontaminierten Nüstern eines Hengstes auf rossige Stuten zu übertragen.

ECKSTEIN (1983) konnte die Übertragung von Frischsamen als weitere Möglichkeit der Weiterverbreitung von *T. equigenitalis* nachweisen, obwohl dessen ungeachtet die künstliche Besamung bei Zusatz eines geeigneten Antibiotikums zum Sperma eine der wichtigen Präventivmaßnahmen zur Verhinderung der Taylorellenverbreitung bei möglichen Krankheitsausbrüchen darstellt.

Neben dem direkten Übertragungsweg spielen bei der Weiterverbreitung des Erregers Manipulationen im Genitalbereich sowohl durch das Pflegepersonal als auch durch zuchthygienisch tätige Tierärzte eine nicht zu unterschätzende Rolle. Der Erreger kann dabei beispielsweise durch manuelle Unterstützung des Hengstes beim Einführen des Penis in die Vagina der zu deckenden Stute oder die Wäsche

von Deckhengsten am gleichen Ort übertragen werden (DAVID et al. 1977, SWERCZEK 1978a, 1978b, TANTURIER et al. 1979, LIGNIERES 1980).

Nach der Infektion des Hengstes mit *T. equigenitalis* kommt es entweder zur Elimination des Erregers nach einer kurzen Keimträgerphase oder zur mehrmonatigen bis mehrjährigen persistierenden Infektion (PLATT et al. 1978, BRAYNS und HENDRICK 1979, TIMONEY und POWELL 1982, SCHLÜTER et al. 1991).

Die Keimansiedlung ist dabei auf die äußeren Abschnitte des Geschlechtsapparates (Penis, Präputium, Fossa glandis der Glans penis, distale Urethra) beschränkt (PLATT et al. 1978, TIMONEY und POWELL 1988).

Eine Besiedlung der inneren Genitalorgane des Hengstes bzw. des Harnapparates infolge einer aufsteigenden Infektion mit *T. equigenitalis* konnte in Infektionsversuchen mit Ponyhengsten durch PLATT et al. (1978) bei bakteriologischen Untersuchungen an einem am 22. d.p. inf. euthanasierten Ponyhengst nicht nachgewiesen werden.

Trotzdem wird die Möglichkeit der Besiedlung der inneren Geschlechtsorgane des Hengstes durch SCHLÜTER et al. (1991) im Zusammenhang mit Erregernachweisen aus Sperma- und Vorsekretproben bei gleichzeitig negativ verlaufenen Untersuchungen von Tupferproben der äußeren Genitalien diskutiert.

#### 2.1.4. Bedeutung der physiologischen Genitalflora des Hengstes

Die Interaktion der physiologisch im Genitaltrakt des Pferdes angesiedelten Bakterienflora mit *T. equigenitalis* wurde durch verschiedene Autoren untersucht.

SWERCZEK (1978c) isolierte aus dem Reproduktionstrakt von Stuten und Hengsten über ein Dutzend verschiedener Bakterien, die *in vitro* einen Hemmhof gegenüber *T. equigenitalis* erzeugten. Dieser vom Autor jedoch nicht weiter differenzierten Normalflora wird eine große Bedeutung in der Unterdrückung und Eliminierung von *T. equigenitalis* und anderen Pathogenen im Genitalapparat des Pferdes zugesprochen.

Diese Saprophyten, aber auch potentiell pathogene Bakterien können sich jedoch insbesondere beim Nachweis streptomyzinsensitiver Taylorellenstämmen infolge Überwucherung von Taylorellenkolonien als Ursache falsch negativer Ergebnisse erweisen (SWERCZEK 1978c, VAISSAIRE et al. 1986).

Über eine *in vitro* beobachtete Hemmwirkung von *Escherichia coli*,  $\beta$ -haemolisierenden Streptokokken und *Staphylococcus aureus* auf das Wachstum von *T. equigenitalis* berichten DOLAN et al. (1984).

VAISSAIRE et al. (1987) führten an 235 Sperma- und 228 Tupferproben von fertilen und infertilen Hengsten unterschiedlicher Pferderassen aus 12 Gestüten Untersuchungen zur Bedeutung der mikrobiellen Besiedlung der Genitalorgane des Hengstes durch. Die Autoren wiesen darauf hin, daß Probleme der Unfruchtbarkeit der Stute und der bakteriell bedingten Aborte auch im engen Zusammenhang mit der Kontamination des männlichen Genitalapparates zu sehen sind. Die Tupferproben der äußeren Genitale der untersuchten Hengste waren mit banalen Saprophyten (Bacillus-, Staphylokokken-, Enterokokken-, Pseudomonas-, Proteus-spezies, Hefen) sowie mit Erregern, die als potentielle Pathogene in der Reproduktion angesehen werden, wie z.B. Klebsiellen, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Streptococcuspezies, Corynebakterien, Moraxellen, stark kontaminiert. Lediglich 4 der untersuchten Spermaproben waren steril, andere enthielten Saprophyten oder für das Genitale der Stute potentiell pathogene Keime. Die von den Autoren aus dem Hengstsperma isolierten Keime wurden wie in der Tabelle 2 ersichtlich eingeordnet.

Tab. 2: Einordnung der aus Hengstsperma isolierten Bakterienspezies

Potentiell pathogene Keime	Saprophytäre Keime
Actinomyces pyogenes	Moraxella urethralis
Streptococcus equisimilis	Aeromonas hydrophila
Streptococcus zooepidemicus	Enterobacter agglomerans
Staphylococcus aureus	Serratia liquefaciens
Escherichia coli	Serratia marcescens
Klebsiella pneumoniae	Staphylococcus epidermidis
Taylorella equigenitalis	Staphylococcus xylosus 1
	Staphylococcus xylosus 2
	Staphylococcus sciuri
	Staphylococcus hyicus
	Staphylococcus capitis
	Staphylococcus simulans
	Acinetobacter lwoffii
	Citrobacter freundii

Das Sperma von 12 Hengsten, aus dem T. equigenitalis isoliert wurde, erwies sich zusätzlich noch als stark kontaminiert mit potentiell pathogenen Keimen. Bei 30 % der positiven Ejakulate war eine Kombination von Streptococcus equisimilis,



*Streptococcus zooepidemicus* und *Staphylococcus aureus* mit *T. equigenitalis* zu beobachten. In 41,6 % der positiven Spermaproben wurde gleichzeitig *Klebsiella pneumoniae* nachgewiesen.

Die Autoren sehen ihre Ergebnisse als Bestätigung der Hypothese an, daß chronische Träger von *T. equigenitalis* auch besonders empfänglich für bakterielle und virale Infektionserreger sind.

Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung einer guten Zuchtkondition von Stuten in der Deckperiode, die nur bei einer optimalen lokalen und allgemeinen Infektionsabwehr in der Lage sind, die vom Hengst während des Koitus massiv übertragenen Keime schnell zu eliminieren.

Die vor und nach dem Deckakt übliche prophylaktische Wäsche des Penis mit antibakteriell wirksamen Substanzen kann dabei einen negativen Effekt auf die Normalflora des Hengstes besitzen. Opportunistische Pathogene wie *T. equigenitalis*, *Klebsiellen* oder *Pseudomonaden* erhalten bei einer Resistenz gegenüber dem verwendeten Chemotherapeutikum nach der Zerstörung der inhibitorisch wirkenden Normalflora die Möglichkeit zur verstärkten Kolonisation (SWERCZEK 1978c, 1979b, ANDRESEN 1987).

## 2.2. Erregercharakterisierung

### 2.2.1. Morphologie

Der Erreger der kontagiösen equinen Metritis ist ein anspruchsvolles gramnegatives, zur bipolaren Anfärbung neigendes unbewegliches, sporen- und geißellooses, nichtsäurefestes Bakterium, dessen Morphologie von kokkoiden Formen bis hin zu ausgeprägten Stäbchen variiert. Die Größe des Bakteriums wird mit  $0,3-0,6 \mu\text{m} \times 1-2 \mu\text{m}$  angegeben. Gelegentlich beobachtete Filamente erreichten eine Länge von  $5-6 \mu\text{m}$  (TIMONEY et al. 1977, TAYLOR et al. 1978).

WADA et al. (1983) ermittelten lichtmikroskopisch die Größe von *T. equigenitalis* mit Kapsel von  $1-2 \mu\text{m} \times 3-5 \mu\text{m}$  und elektronenmikroskopisch die Größe des Erregers ohne Kapsel von  $0,5-0,7 \mu\text{m} \times 1-2 \mu\text{m}$ .

HITCHCOCK et al. (1985) teilten *T. equigenitalis*-Kolonien nach lichtmikroskopischen Untersuchungen phänotypisch nach ihrer Lichtdurchlässigkeit in einen lichtundurchlässigen Kolonietyp, einen transparenten Kolonietyp und einen intermediärtyp ein. Die Autoren wiesen elektronenmikroskopisch eine die Kolonie und den Agar überdeckende,  $13 \text{ nm}$  starke, unregelmäßige elektronendichte Schicht nach. In vergleichenden rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen großer

und kleiner Kolonievarianten bestand das Zentrum der Kolonie der erstgenannten Variante in erster Linie aus kokkoiden Formen und die Peripherie aus Stäbchen, während in der kleinen Kolonievariante die kokkoide Bakterienform dominierte.

Weiterhin wurde zwischen den Bakterien des intermediär lichtdurchlässigen Kolonietyps ein dichtes, unregelmäßiges Netzwerk interzellulärer Fäden beobachtet.

Die elektronenmikroskopisch nachweisbaren Strukturen (Außenmembran, dichte Intermediärschicht, Zytoplasmamembran) von *T. equigenitalis* entsprechen denen anderen gramnegativer Bakterien. Zusätzlich besitzt das Bakterium eine 20 bis 30 nm dicke, hitzelabile Kapsel (TAYLOR et al. 1978, SWANEY und BREESE 1980). Die Außenmembran setzt sich nach HITCHCOCK et al. (1985) aus 3, die Zytoplasmamembran aus 2 elektronendichten Schichten zusammen.

Die Koloniemorphologie von *T. equigenitalis* variiert stark in Abhängigkeit von den verwendeten Nährböden, den Kultivierungsbedingungen und dem Infektionsstadium, in dem sich das infizierte Tier befindet.

TIMONEY et al. (1978d) berichteten von einer Veränderung der Morphologie in Abhängigkeit von der klinischen Situation experimentell infizierter Ponystuten, positive Erregernachweise in der latenten Phase der Infektion beinhalteten *T. equigenitalis* mit einer höheren Tendenz zur Pleomorphie.

Das verwendete Kulturmedium und die Länge der Inkubation können ebenfalls einen Einfluß auf die Bakterienmorphologie besitzen (SWANEY und BREESE 1980, TAINURIER et al. 1981c, SAHU et al. 1982).

Morphologische Unterschiede zwischen Bakterien von Ausstrichen von Bakterienkulturen von EUGON-Kochblutagarplatten und in Gewebeschnitten aus dem Genitalapparat von Stuten nach Anfärbung mit der indirekten Immunfluoreszenztechnik beschreiben ACLAND et al. (1983). Die mittels IFT im Gewebeschnitt angefärbten Taylorellen waren länger und in ihrer Größe einheitlicher als jene aus der Kultur.

SWANEY und SAHU (1978) führten vergleichende Untersuchungen des Wachstums des CEM-Erregers auf Pferdekochblutagar auf der Basis von Tryptose-Blutagar-Basis (Difco Laboratories) und EUGONbroth (Baltimore Biological Laboratories) durch. Auf Tryptoseagar waren die Kolonien nach 24 h auch bei 15facher Vergrößerung nicht sichtbar, sie besaßen nach 72stündiger Bebrütungszeit einen Durchmesser von weniger als 1 mm. Demgegenüber waren auf EUGON-Agar Kolonien bereits nach 24 h unter 15facher Vergrößerung sichtbar, sie erreichten nach 48 h einen Durchmesser von 1 mm und schließlich nach 72stündiger Bebrütungszeit einen Durchmesser von 1,5 mm. Nach dem Zusatz von 0,2 g Natriumsulfit und 0,3 g L-Cystin pro Liter Agar zum Tryptoseagar waren Kolonien auch auf

Tryptoseagar nach bereits 24 Stunden Bebrütungszeit unter 15facher Vergrößerung sichtbar.

Die Kolonien von *T. equigenitalis* sind auf EUGON-Kochblutagar glänzend, rund, konvex sowie cremefarben bis braun und erreichen nach 6 Tagen Inkubationszeit bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Zusatz einen Durchmesser von 2-5 mm (SAHU und DARDIRI 1980).

SAHU (1980) unterscheidet nach 15tägiger Inkubationszeit von Zervixtupferproben und Exsudatausstrichen auf EUGON-Kochblutagar bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Zusatz 3 verschiedene Koloniegrundtypen - den am häufigsten auftretenden glatten, konvexen, runden und glänzenden Typ mit einem Durchmesser von 5-7 mm am 15. Inkubationstag, den auf der Kolonieoberfläche sandartig gekörnten Kolonietyp mit einem Durchmesser von 5-7 mm am 15. Inkubationstag sowie einen mit geringer Häufigkeit zu beobachtenden sehr kleinen Kolonietyp mit einem Durchmesser von 0,15-0,2 mm im Durchmesser. Letzterer Kolonietyp wuchs auf Tryptosekochblutagar als konische, klare bzw. als flache und trübe oder als runde und trübe Variante. Nach mehreren Passagen auf EUGON-Kochblutagar wurde eine Transformation des sehr kleinen Kolonietypes beobachtet. Die Kolonien erreichten nach 7 Tagen Bebrütungszeit einen Durchmesser von 0,75 mm und waren phänotypisch dem glatten Kolonietyp ähnlich.

SAHU et al. (1982) unterscheiden nach 14tägiger Inkubationszeit auf EUGON-Kochblutagar bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Zusatz 4 verschiedene Kolonietypen - glatte, runde, konvexe Kolonien, sandartig gekörnte, runde, flache Kolonien, Kolonien mit Ringbildung und Kolonien mit Bläschen. Auf Tryptosekochblutagar waren nur glatte, runde, konvexe Kolonien zu beobachten.

KAMADA et al. (1987) beschrieben einen langsam wachsenden kleinen, transparenten und einen schnell wachsenden, großen, trüben Kolonietyp, die jedoch keine biochemischen und antigenetischen Unterschiede aufwiesen. Während der 5. Subkultivierung des kleinen Kolonietypes trat eine spontane Reversion vom kleinen zum großen Kolonietyp nach dem 6. Inkubationstag auf.

Das Auftreten eines großen, virulenteren und eines kleinen, weniger virulenten Kolonietyps in Abhängigkeit von der Ausprägung der klinischen Manifestation der Erkrankung bei Stuten beschreiben KANEMARU et al. (1988).

SAHU und DARDIRI (1980) beobachteten nach 5 bis 7 Tagen Bebrütungszeit eine verspätete  $\alpha$ -Haemolyse auf Schafblutagar, ein Gelieren der Kolonien in Wasser sowie eine Verschiebbarkeit der Kolonien auf der Agaroberfläche mit Hilfe einer Öse.

### 2.2.2. Tenazität

Auf Grund der hohen Nährbodenansprüche und des an ein sauerstoffarmes Milieu gebundenen Wachstums kann angenommen werden, daß *T. equigenitalis* eine sehr geringe Tenazität besitzt und deshalb ausserhalb des Genitalapparates des Pferdes nur kurze Zeit überlebt (BLOBEL et al. 1979).

Eine schnelle Abtötung von *Taylorella equigenitalis* erfolgt bei pH-Werten unterhalb von 4,5 (SAHU und DARDIRI 1980).

TIMONEY et al. (1979e) untersuchten die Thermolabilität des CEM- Erregers, die bei Temperaturen über 50°C stark zunimmt. Mit Erreichen dieser Temperaturgrenze führen bereits Einwirkzeiten von einer Minute zur vollständigen Erregerinaktivierung. Ausgehend von dieser Studie sehen die Autoren die üblichen Sterilisationsprozeduren (Autoklavieren, etc.) als vollkommen effektiv zur Abtötung von *T. equigenitalis* an.

*T. equigenitalis* ist ebenfalls sehr empfindlich gegenüber Sonnenlicht. Eine physiologische Kochsalzlösung wirkt auf den Erreger der CEM bakterizid (ANONYM 1979a).

### 2.2.3. Biochemische Eigenschaften

*T. equigenitalis* zeichnet sich durch eine starke Oxydase-, Katalase-, Phosphatase- und Phosphoamidaseaktivität aus, während in anderen der in der bakteriologischen Routinediagnostik angewandten biochemischen Tests eine weitestgehende Inaktivität zu beobachten ist. Das Bakterium besitzt keine Urease, Gelatinase, Desoxyribonuklease, Lipase, Dekarboxylase und ist ebenfalls nicht in der Lage, Kohlenhydrate zu fermentieren, Zitrat zu verwerten, Nitrate zu reduzieren, Indol bzw. H<sub>2</sub>S zu bilden. Mit Hilfe des APYZYM-Systems konnte lediglich eine Aktivität der sauren und alkalischen Phosphatase, verschiedener Esterasen, einer Phosphoamidase und verschiedener Aminopeptidasen nachgewiesen werden (TIMONEY et al. 1977, TAYLOR et al. 1978, DABERNAT et al. 1980b, SAHU und DARDIRI, 1980, TAINTURIER et al. 1981c, KIKUCHI et al. 1982, SUGIMOTO et al. 1980, 1983a).

Diese hinsichtlich der Zuckerfermentation weitestgehende biochemische Inaktivität des Erregers resultiert aus dem sich auf den Zitronensäurezyklus und die oxydative Phosphorylierung beschränkenden Energiemetabolismus, während zuckerab-

bauende Enzyme der Glykolyse und des Hexose-Pentose-Phosphatzyklus nicht nachgewiesen werden konnten (LINDMARK et al. 1982)

Über die Abhängigkeit vom X- und/oder V-Faktor liegen sehr unterschiedliche Untersuchungsergebnisse vor. TAYLOR et al. (1978) beobachteten zwar keine Abhängigkeit vom X- und/oder V-Faktor, jedoch einen wachstumsstimulierenden Effekt des X-Faktors, und schlugen deshalb auch in Hinsicht der von ihnen nachgewiesenen Kreuzreaktionen eines Antitaylorellenimmunserums mit *Haemophilus influenzae* die Zuordnung des CEM-Erregers als neue Spezies des Genus *Haemophilus* unter der Bezeichnung *Haemophilus equigenitalis* vor.

SHREEVE (1978), KIRPAL und BISPING (1980) sowie SAHU und DARDIRI (1980) berichten ebenfalls über eine wachstumsverstärkende Wirkung des X-Faktors (Haemin) bei der Kultivierung des Erregers auf Nähragar und schlossen daraus auf eine X-Faktorabhängigkeit.

LUCIANO COUSINET (1981) wies bei *T. equigenitalis* Protoporphyrin und Porphobilinogen nach und schlußfolgerte daraus die Abhängigkeit des Erregers vom V-Faktor.

DABERNAT et al. (1980b), KIKUCHI et al. (1982) und SUGIMOTO et al. (1983a) verneinten dagegen eine Stimulation des Taylorellenwachstums durch den Zusatz des X- und V-Faktors.

Untersuchungen des Guanin- und Cytosingehalt der DNA von *T. equigenitalis* ergaben mit 36,1 % Guanin/Cytosin einen deutlich niedrigeren Wert als der im Bereich von 37-44 % liegende Guanin- und Cytosingehalt der *Haemophilus*-arten (KILIAN 1976, TAYLOR et al. 1978, SUGIMOTO et al. 1983a).

Mittels DNA-DNA-Hybridisationstechnik konnte zwar eine weitestgehende Homologie der DNA der verwendeten Taylorellenstämme ermittelt werden, verwandtschaftliche Beziehung zu anderen der oben erwähnten Spezies waren jedoch nicht nachweisbar (SUGIMOTO et al. 1983).

Der von BREWER und CORBEL (1983) durchgeführte Vergleich säure-phenol-löslicher Strukturproteine von *T. equigenitalis* mit *Haemophilus*-spezies, Vertretern der Gattungen *Moraxella* und *Pasteurella* mittels Diskelektrophorese ergab das Fehlen verwandtschaftlicher Beziehungen zu *T. equigenitalis* und einheitliche Proteinmuster von Taylorellenisolaten.

Vergleiche der Proteinmuster von Taylorellaisolaten mit der SDS-Gelelektrophorese zeigten ebenfalls eine einheitliche Proteinstruktur der durch LAPAN (1990) untersuchten 56 Stämme.

In Genomuntersuchungen von *T. equigenitalis* mit der Restriktionsenzymanalyse konnte die Existenz von 5 verschiedenen Verdauungsmustern nachgewiesen werden, ohne daß ein Zusammenhang dieser DNA-Gruppen mit anderen Eigenschaften erkennbar war (BLEUMINK-PLUYM et al. 1990, LAPAN 1990).

Gaschromatographische Analysen der Fettsäuremuster von 8 unterschiedlichen *T. equigenitalis*-Isolaten und Vertretern der *Actinobacillus*-*Haemophilus*-*Pasteurella*-Gruppe ergaben insbesondere im Gehalt der C<sub>16</sub>-Fettsäuren (16:1, 16:0) und der C<sub>18</sub>-Fettsäuren (18:2, 18:1, 18:0) eine einheitliche Zusammensetzung innerhalb der Taylorellenisolate bei deutlichen Unterschieden gegenüber Vertretern der *Actinobacillus*-*Haemophilus*-*Pasteurella*-Gruppe (SUGIMOTO et al. 1982).

In Auswertung vergleichender Untersuchungen verschiedener biochemischer und genetischer Parameter von *T. equigenitalis* und Vertretern der Gattungen *Haemophilus*, *Moraxella*, *Brucella*, *Legionella*, *Bordetella*, *Pasteurella*, *Francisella*, *Actinobacillus* etc. wurde durch SUGIMOTO et al. (1983a) die taxonomische Neuzuordnung des Erregers zu einem eigenständigen Genus, dem Genus *Taylorella*, vorgeschlagen. Die Anregung von SUGIMOTO et al. (1983a) wurde durch ROSSAU et al. (1985) nach vergleichenden Betrachtungen mittels DNA-rRNA-Hybridisation von Eigenschaften des Genus *Moraxella* mit denen von *T. equigenitalis* unterstützt.

#### 2.2.4. Virulenzfaktoren

WIDDERS et al. (1985) demonstrierten mittels ELISA die Fähigkeit von *T. equigenitalis*, Immunglobuline verschiedener Spezies (Pferd, Rind, Schaf, Schwein, Hund, Katze, Maus, Meerschwein und Mensch) nichtimmunogen an dessen Oberfläche zu binden. Die dabei nachweisbare maximale Bindung von equinem IgG sowohl als Gesamtmolekül wie auch als Fc- bzw. Fab-Fragment sehen die Autoren als spezielle Adaptation des Erregers zur Verringerung seiner antigenen Wirkung auf das Immunsystem des Wirtes an.

Die durch SWANEY und BREESE (1980) elektronenmikroskopisch nachgewiesene Kapsel ist vermutlich auf Grund einer möglichen antiphagozytären Wirkung wie die bereits o.g. Eigenschaft des Erregers für die lange Persistenz von *T. equigenitalis* im Genitaltrakt mit verantwortlich.

BERTRAM et al. (1982,1983) konnten durch vergleichende Untersuchungen der Reaktion equiner neutrophiler Granulozyten gegenüber *Escherichia coli* und *T. equigenitalis* bei Anwesenheit von Samenplasma, Uterusflüssigkeit oder CEM-

Antiserum eine verminderte Phagozytoseleistung der Granulozyten gegenüber *T. equigenitalis* feststellen. Im Vergleich eines niedertitrigen mit einem hochtitrigen Immunserum führte der höhere Gehalt an Antikörpern zu einem Anstieg der Phagozytoseleistung der Granulozyten sowie zu einer Beschleunigung des intrazellulären Abbaus von *T. equigenitalis*, während im Seminalplasma und in der Uterusflüssigkeit nachweisbares IgG und IgA diesen Effekt nicht bewirkte. Die herabgesetzte Phagozytosefähigkeit equiner neutrophiler Granulozyten könnte nach Meinung der Autoren aus Alterationen der Zellmembran nach Kontakt mit *T. equigenitalis* resultieren.

BERTRAM und JENSEN (1984) gelang es, aus der Zellmembran 2 chemisch ähnliche, serologisch jedoch unterschiedlich reagierende Lipopolysaccharide, von denen eines die Phagozytoseaktivität neutrophiler Granulozyten negativ beeinflusste, zu isolieren.

HITCHCOCK et al. (1985) vermuteten in den von ihnen in dem transparenten und lichtundurchlässigen Kolonietyp elektronenmikroskopisch nachgewiesenen extrazellulären Material nichtproteinischen Ursprungs ein wichtiges, das Abwehrsystem des Wirtes neutralisierendes Antigen.

Diese dargestellten antiphagozytären Eigenschaften von *T. equigenitalis* könnten eine Erklärung für die in Vakzinationsversuchen gemachten Beobachtungen sein, in denen sich vakzinierter Ponystuten trotz hoher Serumantikörpertiter und im Uterussekret nachweisbarer lokaler Antikörper für *T. equigenitalis* empfänglich erwiesen. Sie zeigten nach einer intrauterinen Infektion mit dem Erreger CEM-typische klinische Symptome, die sich lediglich durch geringere Deutlichkeit von denen der nichtvakzinierter Kontrolltiere unterschieden (FERNIE et al. 1980, SAHU 1981, WIDDERS et al. 1986). Gleichartige Beobachtungen wurden in Reinfektionsversuchen gemacht, in denen reinfizierte Stuten in der Regel sehr milde klinische Symptome zeigten (TIMONEY et al. 1979c, SAHU et al. 1980).

LAPAN (1990) überprüfte die Haftmechanismen von *T. equigenitalis* mit HeLa-Zellen in vitro und wies eine D-Mannose-resistente Adhäsion nach. Die Fähigkeit des Erregers, Zytotoxine zu bilden, war bei allen der 56 untersuchten Stämme in unterschiedlichem Ausmaße vorhanden.

Eine deutliche Steigerung der Virulenz des Erregers beim Vorhandensein von Sperma mit und ohne Spermaexpander demonstrierten TIMONEY et al. (1978c, 1978d) in einem Infektionsversuch mit Ponystuten. Die in der Ausbildung deutlicherer klinischer Symptome resultierende Virulenzhöhung geht vermutlich aus der schnelleren Vermehrung von *T. equigenitalis* im Seminalplasma verglichen mit der im Uterussekret hervor (BERTRAM et al. 1983).

Diese Eigenschaft des Seminalplasmas könnte mit dem im Bereich von 7,0 bis 7,7 liegenden pH-Wert des Ejakulates in Zusammenhang gesehen werden, da dieser pH-Wert für die Mehrzahl der vorhandenen Bakterien ein hervorragendes Milieu darstellt (VAISSAIRE et al. 1987).

Eine Beziehung der Koloniegröße von *T. equigenitalis* zur Virulenz des Erregers konnte in Infektionsversuchen mit Ponystuten nachgewiesen werden, in denen die Inokulation der großen Kolonievarianten zur Ausbildung CEM-typischer klinischer Symptome führte, währenddessen sich die kleine Kolonievariante als weniger virulent erwies (KAMADA et al. 1987, KANEMARU et al. 1988). Die Abhängigkeit der Schwere der klinischen Symptome von der in vivo stattfindenden Transformation des kleinen Kolonietypes in einen großen Kolonietyp wurde von SAHU und WEBER (1982) in einem Infektionsversuch mit Ponystuten demonstriert.

Trotz dieser Beobachtungen sind Virulenzunterschiede zwischen verschiedenen *T. equigenitalis*-Stämmen bisher noch nicht registriert worden (TAINTURIER et al. 1988a).

Hinweise über avirulente Stämme von *T. equigenitalis* liegen in der Literatur nicht vor.

Trotz der bereits aufgeführten Erkenntnisse über Virulenzfaktoren von *T. equigenitalis* bestehen noch zahlreiche offene Fragen hinsichtlich der zur Virulenzsteigerung im equinen Genitaltrakt führenden Faktoren. Da der Erreger der CEM sowohl bei tragenden Stuten während einer normal verlaufenen Gravidität wie auch aus abor- tierten Feten und deren Fruchthüllen isoliert wurde, ist beispielsweise die Frage, ob eine zum Abort führende Virulenzsteigerung während der Trächtigkeit stattfinden kann, noch ungeklärt (TIMONEY 1979, NAKASHIRO et al. 1981, TAINTURIER et al. 1982a, FONTJUNE et al. 1989).

#### 2.2.5. Immunologie

CORBEL und BREWER (1982) untersuchten die Ultraschall- bzw. Phenolextrakte von vier *T. equigenitalis*-Stämmen in der Immunelektrophorese mit polyvalenten Kaninchenserum und stellten bei den verwendeten Stämmen einheitlich 11 präzipitierende Antigene fest, von denen 2 hochmolekulare Antigene, ein Polysaccharid und ein LPS-Protein-Komplex, an der Zelloberfläche lokalisiert waren. Beide Oberflächenantigene wurden als bedeutsam für die serologische Reaktion infizierter Pferde betrachtet und reagierten ebenfalls mit Seren gesunder Rinder.



Dieser LPS-Protein-Komplex steht in enger Verbindung mit Hauptpolypeptiden der Zelloberfläche (CORBEL und BREWER 1983).

SUGIMOTO et al. (1988) isolierten die Außenmembran von *T. equigenitalis* und konnten mittels SDS-Gelelektrophorese Hauptproteinbanden mit einem Molekulargewicht von 50, 48, 41, 33, 27 und 15 kdal nachweisen. Die drei untersuchten Stämme zeigten weder qualitative noch quantitative Unterschiede im Proteinhemmer. Beim Vergleich von Pferdeseren im Westernblot reagierten sowohl prä als auch post infectionem entnommene Seren mit Proteinen im Bereich von >200 bis 29 kdal, jedoch nur postinfektionelle, in der indirekten Haemagglutination und Agglutination positive Seren mit einem 41-kdal-Protein. In der Kreuzimmunelektrophorese mit SDS-Extrakten der Zellmembran stellten die Autoren zwei unterschiedliche LPS-Antigene fest.

LAPAN (1990) wies mit Hilfe eines polyvalenten Immunsersums vom Kaninchen im Westernblot bei 56 Stämmen einheitlich neun immunologisch wirkende Proteinbanden im Molekulargewichtsbereich zwischen 130 und 14 kdal nach, ohne daß dabei ein negatives Kontrollserum unspezifische Reaktionen zeigte.

Als Ursache für den Nachweis von agglutinierenden und fluoreszierenden Antikörpern im Serum von gesunden Menschen wie auch von Patienten mit einer nicht-gonokokkenbedingten Urethritis werden ebenfalls Antigenverwandtschaften von *T. equigenitalis* mit *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae* und anderen Kommensalen und opportunistischen Pathogenen des menschlichen Genitaltraktes wie z.B. *Moraxella*- oder *Acinetobacterspezies* angesehen. Die Vermutung, daß serologische Reaktionen bei Menschen aus latenten Infektionen mit *T. equigenitalis* resultieren, konnte auf Grund von fehlenden Erregernachweisen und negativen Serumuntersuchungen bei Personen (Tierärzte), die im Zuchtgebiet von New Market (England) einen engen Kontakt mit immzierten Pferden hatten, bisher nicht bestätigt werden (ANONYM 1978, SMITH und YOUNG 1978, TAYLOR und ROSENTHAL 1978a, 1978b, WILKINSON und RODIN 1978, TAYLOR et al. 1979, CLAY und BURDON 1980, FÜZI 1980, MARDH et al. 1980).

Das Auftreten von agglutinierenden und präzipitierenden Antikörpern in bovinen Seren unabhängig vom Reproduktionsstatus der Tiere im Rahmen der Abortursachenuntersuchung und der Routineuntersuchung klinisch gesunder Tiere wird ebenfalls in Zusammenhang mit den bereits oben erwähnten Antigenverwandtschaften gesehen, obwohl trotz nachgewiesener Reaktionen der beiden beschriebenen Oberflächenantigene mit Seren gesunder Rinder keine serologischen Kreuzreaktion mit *Moraxella*- und *Acinetobacterspezies* nachweisbar waren (CORBEL und BREWER 1980, 1982).

Hinsichtlich des direkten Nachweises von Antigengemeinschaften zwischen *T. equigenitalis* und Vertretern der Gattungen *Haemophilus*, *Brucella*, *Pasteurella*, *Yersinia*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Moraxella* und *Aeromonas* mit Hyperimmunseren liegen sehr gegenteilige Untersuchungsergebnisse vor.

Während TAYLOR et al. (1978) mit einem im Kaninchen erzeugten Immunserum Kreuzreaktionen gegen *Brucella abortus*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus influenzae*, *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica* nachwiesen, traten diese Kreuzreaktionen bei gleichartigen Untersuchungen durch DABERNAT et al. (1980b) nicht auf.

#### 2.2.6. Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika

Die in-vitro-Wirkung verschiedener Chemotherapeutika auf eine Vielzahl von *T. equigenitalis*-Isolaten wurde durch zahlreiche Autoren geprüft.

*T. equigenitalis* ist hochempfindlich gegenüber den Makrolidantibiotika Erythromycin, Tylosin, Spiramycin, Oleandomycin, Katamycin und Josamycin, den Tetracyklinen Tetracyclin, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin und Minozyclin, den Peptidantibiotika Bazitrazin, Colistin und Polymyxin B, den Penizillinen Ampizillin und Amoxizillin, den Aminoglykosiden Neomycin, Kanamycin, Furaziomycin, Gentamycin, Amikazin, Toburamycin, Spectomycin und Aminodeoxykanamycin, den Chloramphenikolen Chloramphenikol und Thiamphenikol, den Cephalosporinen Cephazolin, Cefalotin, Cefotiofur und Cefotetan, dem Pleuromutilin Tiamulin, dem Nitrofuran Furazolidon, dem phosphorylierten Polysaccharid Flavophospholipol sowie gegenüber Novobiozin und Nalidixinsäure. Eine stammabhängige Empfindlichkeit besteht gegenüber Penizillin G und Streptomycin, wobei beim erstgenannten Antibiotikum eine hoch- bis mittelgradige Empfindlichkeit und beim letztgenannten entweder eine hochgradige Empfindlichkeit oder eine Resistenz besteht. Eine mäßige Empfindlichkeit besitzt der CEM-Erreger gegenüber Dicloxacillin und Lincomycin.

*T. equigenitalis* ist resistent gegen Clindamycin, Sulfadimethoxin, Trimethoprim und Metronidazol (DABERNAT et al. 1980a,b, SUGIMOTO et al. 1981, KAMADA 1986, EGUCHI et al. 1988a, VAISSAIRE 1989, WYFFELS 1989)

Die höchste in-vitro-Empfindlichkeit besitzt *T. equigenitalis* gegenüber dem  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum Cefataxim (TIMONEY et al. 1983).

Hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber Streptomycin lassen sich die angezüchteten Taylorellenisolate in streptomycinresistente und streptomycinempfindliche Stämme einteilen (SWERCZEK 1978a).

KAMADA et al. (1986) wiesen bei 4 streptomyzinsensitiven Stämmen eine mit der Anzahl der Passagen auf antibiotikafreien Nährböden zunehmende Verringerung der Empfindlichkeit gegenüber Streptomycin nach. Die zur Hemmung von *T. equigenitalis* notwendige Streptomyzinkonzentration stieg dabei von 12,5 µg/ml auf 200 µg/ml an. Ausgehend von ihren Untersuchungen schlossen die Autoren auf ein bei streptomyzinsensitiven Stämmen vorhandenes, bei der Subkultivierung aktiv werdendes Enzym zur Streptomyzinaktivierung.

EGUCHI et al. (1988a) ermittelten im Agarverdünnungstest die Chemotherapeutikaempfindlichkeit von 68 im Jahre 1985 isolierten *T. equigenitalis*-Stämmen und konnten, verglichen mit den Untersuchungen von SUGIMOTO et al. (1981), trotz des seit 1980 intensiven Einsatzes von Ampizillin in der CEM-Therapie keine Resistenzentwicklung nachweisen.

Durch Übereinstimmung beim Vergleich ihrer eigenen Untersuchungsergebnisse mit denen von SUGIMOTO et al. (1983a) kamen KAMADA et al. (1986) zu dem Schluß, daß *T. equigenitalis* keine für die Antibiotikaresistenz von Bakterien verantwortlichen R-Plasmide besitzt. Diese Vermutung wurde durch molekularbiologische Untersuchung von LAPAN (1990) bestätigt.

Demgegenüber wies SCHNELLER (1991) erstmalig eine Resistenz von *T. equigenitalis* gegenüber Penizillin nach, die vermutlich aus dem häufigen Gebrauch dieses Antibiotikums als Mittel der Wahl zur Bekämpfung streptokokkenbedingter Endometritiden in der zuchthygienischen Praxis resultiert.

SCHLÜTER et al. (1991) beschrieben ebenfalls die Entwicklung von Resistenzen gegenüber Penizillin, Streptomycin und Nitrofurantoin eines *T. equigenitalis*-Stammes im Verlaufe einer intensiven antibiotischen Behandlung eines Zuchthengstes.

Eine deutlich geringere in-vitro-Wirksamkeit von Ampizillin konnten TIMONEY et al. (1978c, 1978d) in einem Infektionsversuch mit Ponystuten nachweisen. Die Autoren mischten in ein aus gleichen Teilen Sperma und Samenexpander bestehendes Gemisch Ampizillin bis zu einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml zu und inokulierten dieses zwei Ponystuten, die daraufhin Keimträger wurden. Inwieweit eine zu kurze Einwirkzeit des Antibiotikums als Ursache für dessen Unwirksamkeit gegen *T. equigenitalis* in dieser Versuchsanordnung trotz der in Hinsicht auf die Ergebnisse von KAMADA et al. (1986) dreifachen MİK eine Rolle spielt, ließen die Autoren offen.

Eine ebenfalls deutlich verringerte in-vivo-Wirksamkeit gegenüber der in-vitro-Wirkung demonstrierten ARKO und WONG (1980) in ihrem Infektionsmodell mit Mäusen an Hand von Chlorhexidin, in dem zur in-vivo-Abtötung von *T. equigenitalis* 10fach höhere Chlorhexidinkonzentrationen notwendig waren:

Diese Diskrepanz zwischen in-vitro- und in-vivo-Wirkung von Desinfektionsmitteln wurde ebenfalls durch TAINTURIER et al. (1988b) beschrieben. Eine lokale Behandlung des Penis nach dem Deckakt mit einer infizierten Stute durch Eintauchen in eine 4 %ige Chloraminlösung bzw. 4 %ige Lösung von jodierten Polyvinylpyrrolidon verhinderte trotz einer in vitro nachgewiesenen Wirksamkeit gegenüber *T. equigenitalis* die Ansiedlung des Erregers im Genital des Deckhengstes nicht.

Trotz der in zahlreichen Untersuchungen nachgewiesenen hohen Empfindlichkeit von *T. equigenitalis* gegenüber einer Mehrzahl der in der Veterinärmedizin eingesetzten Chemotherapeutika besteht im Falle einer durchzuführenden Therapie die unbedingte Notwendigkeit, vor und im Verlaufe einer Behandlung infizierter Tiere die Resistenzlage der isolierten Taylorellenstämme zu überprüfen (LIGNIERES 1980).

### 2.3. Klinik

Klinische Erkrankungen beim Hengst wurden trotz erfolgreicher Nachweise von *T. equigenitalis* bisher nicht beobachtet (PLATT et al. 1978, TAYLOR et al. 1978, TAINTURIER et al. 1979, 1981a, 1982a, ECKSTEIN 1983, ODA et al. 1983, VAISSAIRE et al. 1986, 1987, KÖHLER 1987).

Durch BLOBEL et al. (1979) wurden lediglich farbliche Veränderungen des Ejakulats von normal milchig nach schmutziggrau beschrieben.

LORIN et al. (1984) beobachteten bei einem infizierten Hengst eine einseitige, hochgradig schmerzhaft, indurierende und therapeutisch gut beeinflussbare Orchitis, bei gleichzeitigem Nachweis von Mykoplasmen im Ejakulat. Die Frage, auf welchen der beiden genannten Erreger diese Krankheitsbild jedoch zurückzuführen ist, kann bisher nicht eindeutig beantwortet werden, da auch offene Fragen über die Pathogenität der in Genitalorganen von Pferden nachgewiesenen Mykoplasmen-spezies bestehen (KIRCHHOFF 1982).

Wegen der Tatsache, daß der CEM-Erreger beim Hengst keine klinisch manifeste Infektion hervorruft, spielt der Deckhengst als unauffälliger Träger von *T. equigenitalis* bei der Verbreitung der Infektion eine bedeutende Rolle (KLUG et al. 1980, BLOBEL und BRÜCKLER 1981, KULLER 1983).

#### 2.4. Pathologie

PLATT et al. (1978) führten pathologisch-anatomische und pathologisch-histologische Untersuchungen an einem am 22. d.p. inf. euthanasierten Ponyhengst durch. Dabei zeigten die Organe des Urogenitalapparates (Hoden, Samenleiter, Bulbourethraldrüsen, Samenblase, Nierenbecken, Harnleiter und Harnblase) keine Anzeichen einer entzündlichen Veränderung. Die Autoren beschreiben lediglich eine milde, nichtspezifische testikuläre Degeneration und schlossen aus ihren Untersuchungen, daß eine ascendierende Infektion nicht stattgefunden hatte.

#### 2.5. Prophylaxe und Therapie

Ausgehend von der Möglichkeit der Infektion mit *T. equigenitalis* im Fohlenalter und der sich anschließenden mehrjährigen Keimpersistenz ist eine intensive zucht-hygienische Überwachung von Hengsten vor der ersten Zuchtbenutzung in Kombination mit mehreren Testbedeckungen als primäre Prophylaxemaßnahme anzusehen. Bei einem Verzicht auf Testbedeckungen wird die zuchthygienische Untersuchung der ersten 5 gedeckten Stuten vom 1. bis 5. Tag nach dem ersten Deckakt als notwendig angesehen (TIMONEY 1979, LIGNIERES 1980, TIMONEY und POWELL 1982, TIMONEY und STRICKLAND 1982).

Von Hengstfohlen CEM-positiver Stuten sind vor Erreichen des 3. Lebensmonats mindestens dreimal im Abstand von minimal 7 Tagen Tupferproben von Penisschaft und Penisspitze bakteriologisch auf *T. equigenitalis* zu untersuchen (ANONYM 1982a).

Die dreimalige bakteriologische Untersuchung von Tupferproben aus der Urethra, der Eichelgrube, dem Penisschaft sowie dem Vorsekret auf *T. equigenitalis* und andere Erreger von Genitalinfektion im Abstand von minimal 7 Tagen vor dem Beginn der Decksaison empfehlen DAVID et al. (1977).

In diese prophylaktischen Untersuchungen vor dem Beginn der Decksaison sind ebenfalls Suchhengste einzubeziehen (ANONYM 1982a). Nach DAVID et al. (1978) sollte auf Grund der hohen Kontagiosität des Erregers der CEM ein direkter Kontakt zwischen dem äußeren Genitale der Stute und dem Probierhengst vermieden werden.

Der verstärkte Einsatz der künstlichen Besamung in der Pferdazucht insbesondere der Vollblutzucht, stellt eine der wichtigsten Präventivmaßnahmen zur Unter-

brechung der Infektionskette der CEM und damit einer weiteren Ausbreitung von *T. equigenitalis* dar. Hengste mit CEM-Geschichte sollten trotz wiederholter negativer bakteriologischer Untersuchungen nach einer Behandlung der Nutzung in der KB zugeführt werden, um auf diesem Wege eine Weiterverbreitung zu vermeiden (BOWEN 1978, ROSSDALE 1978, ROSSDALE et al. 1979).

Dabei kann durch Zusatz geeigneter Antibiotika (z.B. Gentamycin oder Penizillin in Kombination mit Polymyxin) zum Ejakulatverdünner eine wirksame Antibiose gegen *T. equigenitalis* erzielt werden, ohne gleichzeitig einen negativen Effekt auf das Sperma zu induzieren (BROOK 1978, TIMONEY et al. 1978e)

Der hohen Kontagiosität des Erregers ist bei Manipulationen an den äußeren Genitalien des Hengstes durch Benutzung steriler Instrumente, von Einweghandschuhen usw. Rechnung zu tragen. Zudem sind alle im Deckbetrieb erforderlichen Accessoires wie Probierstand und Schweifschützer etc. einer wirksamen Desinfektion zu unterziehen (BLOBEL et al. 1978, 1979, POWELL et al. 1978, ANONYM 1980a).

Um eine Übertragung von *T. equigenitalis* durch kontaminierte Instrumente und Metalloberflächen zu vermeiden, empfehlen SWANEY und KISLOW (1981) vor der Reinigung eine 10minütige Behandlung mit 2 %iger Chlorhexidindiacetat-lösung (Nolvasan®) oder 10 %iger Alkyldimethylbenzylammoniumchloridlösung (Roccal II®).

Da auch die routinemäßige Untersuchung aller im Rahmen des Pferdegesundheitsdienstes entnommenen Tupferproben auf *T. equigenitalis* das Freisein der untersuchten Tiere nicht gewährleisten kann, stellt die frühzeitige Erkennung und Bekämpfung von frischen Infektionen eine der wichtigsten Maßnahmen zur Verhinderung der Weiterverbreitung des Infektionserregers in der Pferdepopulation dar (ANONYM 1991).

Folgende Sofortmaßnahmen für Hengste zur Eindämmung eines akuten CEM-Ausbruches wurden von KLUG et al. (1980) vorgeschlagen:

- Decksperre für infizierte Tiere
- Untersuchung der Hengste in der Deckstation
- Waschungen von Präputium, Penis und Eichelgrube der Deckhengste mit 0,5%iger Chlorhexidinlösung

Im Falle einer zu verhängenden Decksperre kann gegebenenfalls auf die Samenübertragung mit Samen von Hengsten, die sich als frei von *T. equigenitalis* erwiesen haben, ausgewichen werden (SONNENSCHNIG und KLUG 1979, KLUG et al. 1980).

Die Therapie *T. equigenitalis*-infizierter Hengste stellt sich im internationalen Schrifttum wiederholt als großes Problem dar, da trotz komplexer und intensiv durchgeführter Behandlungsregime immer wieder von positiven Erregernachweisen nach der Behandlung berichtet wird.

Für die Therapie infizierter Hengste wird eine lokale Behandlung von Präputium und Penis in erigiertem Zustand oder nach Sedation und/oder die parenterale Applikation eines geeigneten Antibiotikums vorgeschlagen (DAVID et al. 1977, PLATT et al. 1978, POWELL 1978, BLOBEL et al. 1979, HAZARD et al. 1979). Vergleichende Untersuchungen hinsichtlich der Effizienz einer lokalen und einer systemischen Behandlung artifiziell infizierter Ponyhengste durch TAINTURIER et al. (1981a, 1982a) zeigten, daß eine über 10 Tage im 12stündigen Abstand durchgeführte i.m. Applikation von jeweils 3 g Amoxizillin nicht zur Erregerelimination führte, währenddessen eine einmalige lokale Behandlung des Penis, der Eichelgrube und des Präputiums mit einer 1:2000 verdünnten Chlorhexidinlösung sowie die Instillation von 30 ml dieser Lösung in die Urethra den Erreger der CEM erfolgreich beseitigte.

ANDRESEN (1987) stellt bei der Behandlung infizierter Hengste ebenfalls die lokale gründliche Wäsche und Desinfektion der äußeren Genitale mit 0,1 bis 0,2 %iger Chlorhexidinlösung in den Vordergrund.

Die Behandlung von 4 Zuchthengsten in mehreren Zyklen wird durch SCHLÜTER et al. (1991) beschrieben. Diese bestanden aus Verabreichungen von systemisch wirkenden Chemotherapeutika (Chloramphenikol, Oxytetracyclin, Benzylpenicillin) und Waschungen des Penis und Präputiums, der Desinfektion des Penis mit einer einprozentigen Chlorhexidinlösung, der intraurethralen und intravesikulären Instillation von 50-100 ml einer Antibiotikasuspension und des Einstreichens des Penis und Präputiums mit Chloramphenikolsalbe.

Neben der lokalen und systemischen Antibiotikaapplikation verwendeten die Autoren in der Therapie eines Zuchthengstes ein homologes CEM-Hyperimmunserum sowie ein Präparat (Resactin®) zur unspezifischen Reizkörpertherapie. Dieser Hengst konnte erst nach 10 Behandlungszyklen als erregerrfrei angesehen werden, wogegen die übrigen 3 Tieren bereits nach 2 bis 4 Zyklen frei von *T. equigenitalis* waren. Die Kontrolle des Behandlungserfolges erfolgte durch eine mehrmalige bakteriologische Untersuchung von Tupferproben aus der Urethra, der Eichelgrube, dem Präputium sowie von Vorsekret und Ejakulat der Hengste. Dabei ist bemerkenswert, daß selbst nach drei aufeinanderfolgenden bakteriologisch negativ verlaufenden Untersuchungen *T. equigenitalis* erneut isoliert wurde.

Zur Erhöhung der diagnostischen Sicherheit in der Kontrolle des Behandlungserfolges wird die Benutzung von Teststuten vor dem Deckeinsatz und weitere Verfolgsuntersuchungen der gedeckten Stuten sowie des Deckhengstes während des Deckeinsatz als unbedingt notwendig angesehen (SCHLÜTER et al. 1991).

DAVID et al. (1977) empfehlen eine orale Applikation von Nitrofurantoin über 5 Tage in Verbindung mit einer dreimaligen gründlichen Reinigung des Penis und des Präputiums mit Chlorhexidin und/oder Nitrofurazon.

Bei der lokalen Behandlung ist der Eichelgrube (Fossa urethrae) als Hauptsitz des Erregers besondere Aufmerksamkeit zu schenken (HAZARD et al. 1979).

Frühestens eine Woche nach Beendigung einer Behandlung ist mit einer dreimaligen, im 7tägigen Rythmus zu wiederholenden bakteriologischen Untersuchungen von Tupferproben des Penischaftes, der Eichelgrube, der Urethra und des Vorsekretes der Behandlungserfolg zu überprüfen (DAVID et al. 1977).

Die medikamentelle Therapie einer *T. equigenitalis*-Infektion ist, wie bereits im Pkt. 2.2.6. hingewiesen wurde, unbedingt auf der Basis eines Antibiotogramms durchzuführen.

## **2.6. Labordiagnostischer Nachweis von *T. equigenitalis***

### **2.6.1. Probenentnahme und Transport**

Der erfolgreiche kulturelle Nachweis von *Taylorella equigenitalis* stellt insbesondere bei chronischen Trägern wie dem Hengst aufgrund der Biologie des Erregers gewisse Bedingungen an die Probenentnahme, den Transport zur Untersuchungseinrichtung und an das untersuchende bakteriologische Labor selbst (TAINTURIER et al. 1979). Da die herkömmlichen "Trocken"-Tupfer für diesen Zweck ungeeignet sind, ist es notwendig, einen mit Transportmedium befeuchteten zarten Wattetupfer am Probenentnahmeort mehrmals kräftig hin und her zu bewegen und ihn anschließend wieder in das Transportmedium zurück zu verbringen (BLOBEL et al. 1979, CHANDLER 1979).

In Untersuchungen hinsichtlich der Überlebenszeiten von *T. equigenitalis* in Stuart-Transportmedium, Amies-Transportmedium ohne und mit Holzkohlenzusatz hat sich Amiesmedium mit Holzkohlenzusatz als Transportmedium mit den höchsten Überlebensraten erwiesen. Der Erreger kann bei Raumtemperaturen in Amiesmedium mit Holzkohlenzusatz bis zu 10 Tage lebensfähig bleiben (ATHERTON 1978b, SAHU et al. 1979, ENGVALL 1985).

TAINTURIER et al. (1982b) verglichen die Nachweissraten von *T. equigenitalis*



nach 3 bis 4tägigen Transport der Proben im Amies-Transportmedium mit Holzkohlenzusatz bzw. im Transportmedium PORTAGERM® (BIOMERIEUX) und gaben dabei dem letztgenannten Transportmedium den Vorzug.

Die Empfindlichkeit und hohen Nährbodenansprüche von *T. equigenitalis* sowie die drohende Überwucherung der Erregers durch Kontaminanten erfordern nach der Probenentnahme einen schnellen Transport der Tupferproben in einem geeigneten Transportmittel bei Temperaturen von maximal 4°C, bei ungekühlten Transport ist die Transportzeit auf 24 h zu begrenzen (TIMONEY et al. 1978b, ENGVALL 1985).

KIRPAL und BISPING (1983) sehen dagegen die Zeitdauer von 3 Tagen zwischen Probenentnahme und Auftragen des Probenmaterials auf Nährböden als maximale Transportzeit an.

Bei einer verlängerten Transportdauer hat sich die Lagerung des die Proben enthaltenden Transportmediums in Trockeneis als vorteilhaft erwiesen (KNOWLES et al. 1978, PIERSON et al. 1978, SWERCZEK 1979b, KAMADA et al. 1981).

Hinsichtlich des Untersuchungsmaterials eignen sich beim Hengst zum Nachweis des Erregers Proben aus der Fossa glandis der Glans penis (Eichelgrube), dem Präputium, der Urethra, das Vorsekret sowie das Ejakulat, wobei im allgemeinen bei der bakteriologischen Untersuchung der Fossa glandis der Glans penis und dem Vorsekret der Keimnachweis am häufigsten gelingt (BLOBEL et al. 1978, 1979, KITZROW und BLOBEL 1980, KLUG et al. 1980, MERKT et al. 1980).

SIMPSON und EATON-EVANS (1978) sowie POWELL (1981) sehen analog zum Klitorisgebiet der Stute die Eichelgrube, die Harnröhrenöffnung sowie die Präputialfalten des Hengstes als bevorzugten Kolonisationsort potentieller Pathogene wie *T. equigenitalis* und damit als günstigen Nachweisort an.

VAISSAIRE et al. (1987) sahen das Ejakulat bei einer schnell nach der Entnahme erfolgenden Untersuchung als besonders günstig zum Nachweis von *T. equigenitalis* an und empfahlen aus ihren Erfahrungen, den Probenansatz innerhalb von 24 bis maximal 36 h nach der Entnahme durchzuführen, da sonst empfindliche Keime wie *T. equigenitalis* infolge der Einwirkung vorhandener Begleitkeime nicht mehr nachweisbar sind.

TAINTURIER et al. (1988b) halten Tupferproben aus der Harnröhrenöffnung und der Eichelgrube für günstiger als Spermaproben zum Erregernachweis für den Fall, daß der Transport ins Untersuchungslabor länger als 48 Stunden dauert.

Zur bakteriologischen Kontrolle von Hengstfohlen infizierter Stuten werden Tupferproben von Penischaft sowie der Glans penis herangezogen (CHANDLER 1979, ANONYM 1982a).

### 2.6.2. Primärisolation des Erregers

*Taylorella equigenitalis* ist hinsichtlich seiner Ansprüche an spezielle Nährböden und eine mikroaerophile Bebrütungsatmosphäre ein sehr anspruchsvolles Bakterium, ein Grund, weshalb der Erreger der CEM bei der bisher üblichen bakteriologischen Untersuchung von Genitaltupferproben zur Erfassung pathogener und fakultativ pathogener Bakterienarten des Genitalapparates nicht erfaßt wurde (KIRPAL und BISPING 1980).

Eine mikroaerophile Bebrütung, d.h. ein Gehalt von 5-10 % CO<sub>2</sub> in der Luft stellen günstige Bedingungen für die Anzüchtung des Erregers dar, wobei auch ein Gemisch aus 85 % N<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> und 5 % O<sub>2</sub> ein gutes Wachstum garantiert (TAYLOR et al. 1978, SUGIMOTO et al. 1980). Der für die Anzüchtung von *T. equigenitalis* notwendige Gehalt an CO<sub>2</sub> in der Luft kann dabei sehr einfach mit einer brennenden Wachskerze in einem Exsikkator erzeugt werden (BLOBEL et al. 1978). KIRPAL und BISPING (1980) und KAMADA et al. (1983b) registrierten in einer Atmosphäre von 95 % N<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> ein besseres Wachstum als bei mikroaerophilen Bedingungen mit 5-10 % CO<sub>2</sub>. Demgegenüber beobachteten FLEMING und TRIBE (1977) unter strikt anaeroben Bedingungen ein sehr spärliches Wachstum des Erregers.

Die optimale Wachstumstemperatur von *T. equigenitalis* liegt bei 37°C, wobei aber auch im Bereich von 30 °C bis 41 °C ein Wachstum eintritt (TAYLOR et al. 1978). Zur Anzüchtung von *T. equigenitalis* werden zahlreiche feste und flüssige Nährmedien beschrieben. Der am häufigsten eingesetzte Nährboden ist Kochblutagar auf EUGON-Agarbasis, dem 10 % Pferde-, Rinder- oder Schafblut und 300 µg/ml L-Cystin zugesetzt werden. Eine Zugabe von 200 µg/ml Natriumsulfit wirkt sich positiv auf das Taylorellenwachstum aus (ATHERTON 1978a, KIRPAL und BISPING 1980, BLOBEL und SCHLIESSER 1981). Der Zusatz von Haemin zum Nährmedium anstatt einer Blutsupplementierung bzw. zusätzlich zur Blutsupplementierung wird ebenfalls als wachstumsfördernd beschrieben (SWANEY und SAHU 1978, SHREEVE 1978, MICHAJLOV et al. 1988)

SWERCZEK (1980) beschreibt eine Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von Feldisolaten von der zur Kochblutagarherstellung auf das verwendete Pferdeblut einwirkenden Hitze. Dabei führte die Einwirkung sowohl zu niedriger (<<80°C) als auch zu hoher (>>80°C) Temperaturen auf das Blut zu einer Verzögerung des Taylorellenwachstums. Der Autor empfiehlt einen Agar mit 10 %igen Pferdeblutzusatz, welcher sich zu 25 % aus Kochblut und zu 75 % aus Frischblut zusammensetzt.

Die zur Primäranzüchtung des CEM-Erregers verwendeten Nährmedien müssen nach Untersuchungen von ATHERTON (1978a) unbedingt dextrosefrei sein, um die Bildung des Taylorellenwachstums hemmender Metaboliten durch ubiquitär auftretende *Escherichia coli* zu verhindern. Dieser Empfehlung ist insbesondere bei der Verwendung streptomyzinfreier Nährmedien zum Nachweis streptomyzinempfindlicher Taylorellenstämme Rechnung zu tragen.

Um der Gefahr der Wachstumshemmung bzw. der Überwucherung von *T. equigenitalis*-Kolonien durch Begleitkeime (Bazillusspezies, Proteusspezies, Schimmelpilze etc.) entgegenzuwirken, wurde von verschiedenen Autoren der Einfluß des Zusatzes verschiedener Chemotherapeutika zum Kochblutagar in der Primärisolation des CEM-Erregers überprüft.

ATHERTON (1983) empfahl den Zusatz von 200 µg Streptomycin und 5 µg Amphotericin B pro ml Agar zu Kochblutagar zum Nachweis streptomycin-resistenter Stämme bzw. die Supplementierung von 5 µg/ml Clindamycin, 1 µg/ml Trimethoprim und 5 µg/ml Amphotericin B zu Kochblutagar für die Anzüchtung streptomyzinsensitiver Stämme.

Beim Anlegen der Kulturen zum Primärnachweis von *T. equigenitalis* ist demzufolge darauf zu achten, daß die Proben sowohl auf streptomyzinhaltigen als auch auf streptomyzinfreien Nährböden ausgestrichen werden.

Ein selektiv wirkendes Medium zur Primärisolation von *T. equigenitalis* wurde durch TIMONEY et al. (1982) beschrieben. Das sich durch eine komplette Hemmung von grampositiven Bakterien, teilweisen Unterdrückung von gramnegativen Bakterienspezies (ausgenommen *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas*spezies) und Inhibition des Wachstums von *Mucor*spezies auszeichnende Medium enthält folgende Komponenten: EUGON-Agar (glukosefrei), Isovitalax (glukosefrei, Baltimore Biological Laboratories), 5 % Pferdekochblut, 5 % lysiertes Pferdeblut, 1 µg/ml Trimethoprim, 5 µg/ml Clindamycin und 5 µg/ml Amphotericin B.

Zur Subkultivierung und Lagerung des CEM-Bakteriums eignen sich ebenfalls flüssige und halbflüssige Nährmedien (FERNIE 1978, KAMADA et al. 1983b)

Die im internationalen Schrifttum angegebene, zur Primärisolation von *T. equigenitalis* notwendige Inkubationszeit schwankt zwischen 1 und 15 Tagen. TAYLOR et al. (1978) und KAMADA et al. (1981) berichteten von einer "Spur" von Wachstum auf Kochblutagar bereits nach 24stündiger Bebrütungszeit in einer 10%igen CO<sub>2</sub> Atmosphäre, wobei aber im allgemeinen ein Wachstum erst nach 48 h erkennbar war. Während TIMONEY et al. (1977) eine Bebrütungszeit von 2 bis 3 Tagen als ausreichend ansehen, beschreiben WARD et al. (1984) lediglich bei 2 der von ihnen angezüchteten Isolate ein Erscheinen der Kolonien nach einer

48 bis 96stündigen Inkubationszeit, 16 Isolate waren erst nach 5 bis maximal 13tägiger Bebrütungszeit visuell wahrnehmbar.

SWERCZEK (1978a, 1978b, 1979b) berichtet, daß *T. equigenitalis*-Kolonien von Pferden mit einer "aktiven CEM-Infektion" bereits nach 48 Stunden sichtbar werden, während Isolate von chronisch infizierten Tieren eine Inkubationszeit von maximal 15 Tagen bis zur visuellen Wahrnehmbarkeit benötigten. Auf Grund dieser Beobachtungen, wird empfohlen, Proben von Hengsten über einen Zeitraum von mindestens 2 Wochen zu bebrüten, wobei eine Luftfeuchtigkeit von 70 % das Austrocknen der Nährböden verhindert.

Der durch ATHERTON (1978b) empfohlene Zusatz von 5 µg/ml Amphotericin pro ml Agar zur Hemmung des Pilzwachstums auf Kochblutplatten wirkt sich insbesondere bei den genannten Ansprüchen hinsichtlich der Luftfeuchtigkeit als sehr vorteilhaft aus.

Als Ursachen des in erster Linie bei chronisch infizierten Tieren beobachteten verzögerten Wachstums der Taylorellenkolonien werden die Hemmwirkung der schneller wachsenden Kontaminanten in Verbindung mit einer sehr geringen quantitativen Besiedlung der äußeren Genitale, das Vorkommen von langsamwachsenden Stämmen sowie das Auftreten der weniger virulenten, kleinen Kolonievariante in der Phase der latenten Infektion angesehen (SWERCZEK 1978a, 1978b, 1979b, WARD et al. 1984, KAMADA et al. 1986, KANEMARU et al. 1988).

Die kleine Kolonievariante ist dabei im Phänotyp schwer von anderen langsamwachsenden Bakterien zu differenzieren (KANEMARU et al. 1988).

Um die Gefahr des Überwucherns der Kulturen durch i.d.Regel massiv vorhandene Kontaminanten zu vermindern, ist das Anlegen von Verdünnungsaustriichen unbedingt notwendig (FLATSCHER et al. 1984).

Außerdem sollte ein Kontrollstamm zur Prüfung der Inkubationsbedingungen und der verwendeten Nährmedien mitgeführt werden (MACKINTOSH 1981).

### **2.6.3. Differenzierung von *T. equigenitalis***

Die Identifizierung verdächtiger Isolate erfolgt durch Prüfung der Koloniemorphologie, der Morphologie und des Färbeverhaltens der Bakterien in der Gramfärbung, des Nachweises der Zytochromoxydase- und Katalaseaktivität sowie durch die Objektträgeragglutination mit einem spezifischen Antiserum (SONNENSCHNEIN und KLUG 1979, ROGERSON et al. 1984).

Dabei ist unbedingt die vielbeschriebene Pleomorphie von *T. equigenitalis*-Isolaten in Abhängigkeit von der gewählten Inkubationszeit und -bedingungen sowie vom Kulturmedium zu beachten (SAHU et al. 1980).

Auf Grund der gleichen serologischen Eigenschaften aller bisher isolierten Taylorellenstämme bildet die Überprüfung der verdächtigen Kolonien mit einem geeigneten Anti-Taylorella-Hyperimmunserum in der Objektträgeragglutination den Abschluß der Diagnosestellung (ROMMEL et al. 1978, KAMADA et al. 1981).

Dafür sind sowohl in Pferden wie auch in Kaninchen erzeugte Hyperimmunseren verwendbar (SELBITZ et al. 1987, 1988, ULLRICH 1990).

Die Agglutinationsreaktionsreaktion läßt sich durch die Bindung der IgG-Antikörper eines Hyperimmunserums an die Oberfläche Protein-A-positiver *Staphylococcus aureus*-Stämme wesentlich verstärken. Bei dieser Art des serologischen Nachweises treten wegen der verwendeten geringen Zelldichte keine Spontanagglutinationen auf (KITZROW et al. 1979, BLOBEL et al. 1980, MAZUROVA 1985).

Der Abschluß der Identifizierung mit der Objektträgeragglutination kann jedoch durch verschiedene Erregereigenschaften erschwert werden.

Beim Versuch der Diagnosesicherung mittels OSA durch FLATSCHER et al. (1984) waren bei einem nicht geringen Teil der isolierten Stämme die Kolonien so viskös, daß beim Versuch des Zerreibens der Bakterienmasse in physiologische Kochsalzlösung wie auch im Antiserum nur eine grobflockige Suspension erzielt werden konnte und somit aufgetretene Reaktionen zur Diagnosesicherung nicht auswertbar waren.

KIRPAL und BISPING (1980) beschreiben eine geringgradige Spontanagglutination aller von ihnen isolierten Taylorellenstämme mit physiologischer Kochsalzlösung, die aber deutlich geringer war als diejenige mit Antiserum.

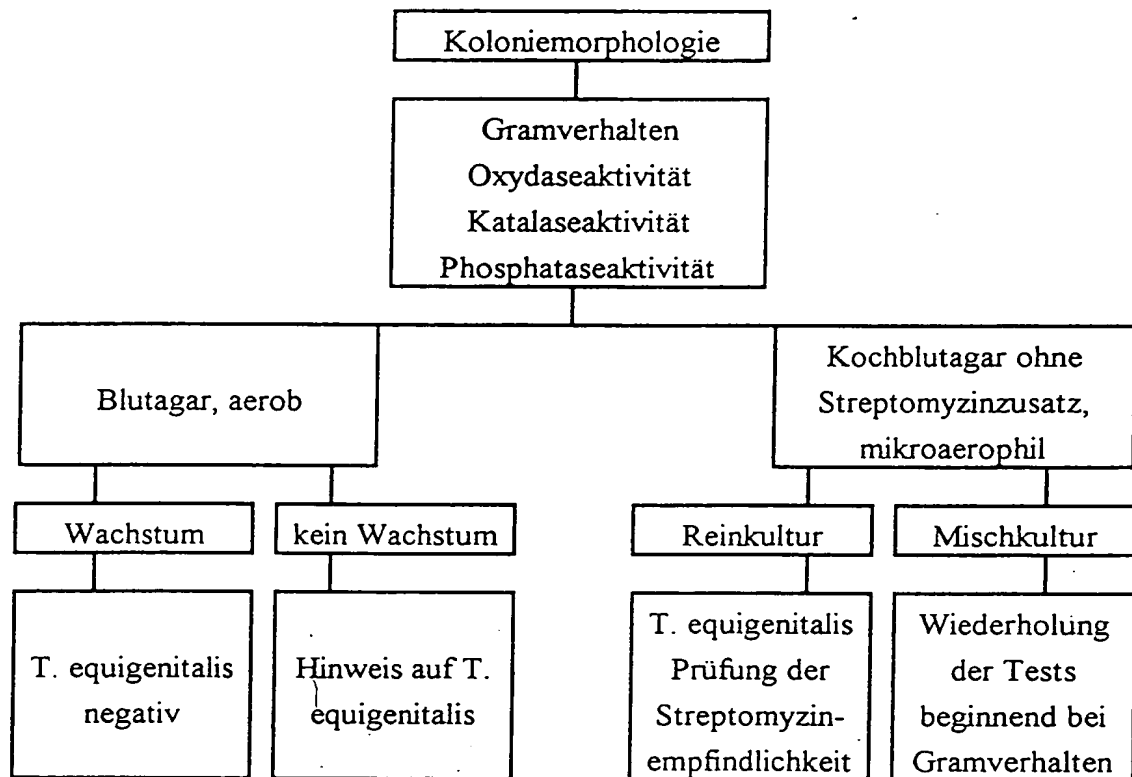
TER LAAK et al. (1989) sowie TER LAAK und WAGENAARS (1990) beobachteten ebenfalls eine Autoagglutination von *T. equigenitalis* in Abhängigkeit vom Kulturmedium und der verwendeten CO<sub>2</sub>-Quelle. Sie empfahlen die Anwendung eines in Ziegen entwickelten Hyperimmunserums im IFT zur Identifizierung isolierter autoagglutinierender Kulturen.

NEILL et al. (1984) empfehlen die Anwendung der Gaschromatographie zur Identifizierung verdächtiger Kulturen für den Fall einer nicht durchführbaren serologischen Diagnosesicherung.

Die Anwendungsmöglichkeit der Biolumineszenz als Methode zur Identifizierung von *T. equigenitalis* wurde durch TIMONEY et al. (1978g) geprüft. Die Autoren beobachteten bei der Bestrahlung von Taylorellenkulturen mit einer Anregungswellenlänge von 254 nm eine für *T. equigenitalis* spezifische apfelgrüne Fluoreszenz.

reszenz.. Da jedoch aus Vertretern von 14 nicht mit *T. equigenitalis* verwandten Bakterienarten sowie aus drei verschiedenen Kulturmedien Material mit gleichen fluoreszierenden und chromatographischen Eigenschaften extrahiert werden konnte, wird der Wert der Spektrofluorometrie für die Diagnostik der kontagiösen equinen Metritis als gering eingeschätzt (BROWN und TIMONEY 1985, BROWN et al. 1985).

MACKINTOSH (1981) erarbeitete das folgende Diagnostikschema zur Identifizierung von *T. equigenitalis*:



#### 2.6.4. Serologische Untersuchungsmethoden

Im Gegensatz zu zahlreichen Untersuchungen durch BENSON et al. (1978), CROXTON-SMITH et al. (1978), DAWSON et al. (1978), FERNIE et al. (1979), ROMMEL und SAHU (1981), TAINTURIER et al. (1981b), KAMADA et al. (1983a), DOLAN et al. (1984), ROGERSON et al. (1984), MACMILLAN und KIDD (1986), EGUCHI et al. (1988b), SELBITZ et al. (1988) und ULLRICH (1990) zur Möglichkeit der diagnostischen Nutzung der humoralen Reaktion des Immunsystems der Stute auf *T.-equigenitalis*-Infektionen mittels SAT, AGT, IDT,

KBR, PHA, ELISA und IFT liegen Ergebnisse über eine mögliche humorale Immunantwort des Hengstes nach einer Infektion mit *T. equigenitalis* nur im beschränkten Umfang vor.

SAHU et al. (1983) untersuchten die Seren von 5 Hengsten, von denen bei 2 Tieren *T. equigenitalis* nachgewiesen wurde. Die Seren blieben in der Serumagglutination, im AGT, dem ELISA, der KBR, der PHA und dem Agargeldiffusionstest negativ.

PAAR (1989) etablierte ebenfalls einen ELISA zum Nachweis von Serumantikörpern und IgA-Antikörpern im Serum bzw. Vorsekreten von Hengsten. In 163 der 165 untersuchten Vorsekrete waren IgA-Antikörperaktivitäten gegen *T. equigenitalis* nachzuweisen, als positiv wurden Vorsekrete von 3 serologisch jedoch negativen Hengsten eingestuft. Die Überprüfung von 170 Hengstseren ergab 3 positive Seren, die jedoch von bakteriologisch negativen Tieren stammten, während Serumproben von 2 bakteriologisch positiven Hengsten im ELISA nicht reagierten. Die Autorin schloß aus ihren Ergebnissen auf eine von der Immunantwort im Serum unabhängige, lokale Reaktion des IgA-System des männlichen Genitaltraktes beim Pferd.

Einschränkend muß jedoch erwähnt werden, daß die Seren der 3 positiven Reagenten keinem weiteren Antikörpernachweisverfahren zur Diagnosesicherung unterzogen wurden.

In Infektionsversuchen mit Traberhengsten gelang es SCHLÜTER et al. (1991), bei einem infizierten Hengst am 6. d.p.inf. mit der PHA Antikörper gegen *T. equigenitalis* nachzuweisen.

TAINTURIER et al. (1982a) führten serologische Untersuchungen mit der SLA, der KBR und dem IFT an 3 infizierten Ponyhengsten durch. Während in der SLA und KBR keine positiven Reaktionen beobachtet wurden, traten bei 2 Ponyhengsten vom 16. d.p.inf. bis zum 51. d.p.inf. positive Reaktionen im IFT in einer Serumverdünnung von 1:5 bis 1:10 auf. Da jedoch in diesen Serumverdünnungen auch bei Pferden ohne nachweisbaren Kontakt mit *T. equigenitalis* positive Reaktionen auftraten, wird als positiver IFT-Titer eine positive Reaktion ab einer Serumverdünnung von 1:20 angesehen (TAINTURIER et al. 1981b, 1982a).

PITRE et al. (1979) wiesen bei 3 Hengsten positive Reaktionen in der KBR nach.

#### 2.6.5. Diagnostische Zusatzmethoden

Die Anwendungsmöglichkeit der Biolumineszenz als Methode zur Schnelldiagnostik der CEM wurde durch TIMONEY et al. (1978g) geprüft. Bei der

Bestrahlung des Vorsekretes von 2 infizierten Hengsten mit kurz- und langwelligem UV-Licht (254 nm, 365 nm) wurde im Gegensatz zu gleichartigen Untersuchungen am Vaginalausfluß infizierter Stuten keine *T. equigenitalis* typische, apfelgrüne Fluoreszenz beobachtet. Die fehlende Fluoreszenz könnte mit dem geringen quantitativen Niveau der Keimbesiedlung der Schleimhäute des Genitalapparates des Hengstes als symptomlosem Keimträger und der daraus resultierenden geringgradigen Keimausscheidung in Zusammenhang stehen.

SWERCZEK (1981) empfiehlt den Tierversuch zur Identifizierung chronisch infizierter oder verdächtiger Hengste, bei denen in der bakteriologischen Untersuchung auf Grund der starken Hemmwirkung der Normalflora kein Erregernachweis gelingt. Dem verdächtigen Hengst wird dabei aus der Eichelgrube Smegma entnommen und dieses anschließend in den Uterus einer Stute inokuliert. Im positiven Falle sind am 3. d.p. inoc. Taylorellen in Reinkultur zu isolieren.

Der Einsatz der Immunfluoreszenztechnik zum direkten Erregernachweis in Exsudaten und Abstrichen des equinen Genitalapparates wird zwar von verschiedenen Autoren als schnellere und möglicherweise empfindlichere Methode als der kulturelle Nachweis angesehen, Angaben über einen Einsatz dieser Art des Nachweises von *T. equigenitalis* in der Praxis liegen jedoch noch nicht vor (ACLAND et al. 1983, ULLRICH et al. 1987).

### 3. Problemstellung

Ausgehend von der Analyse des internationalen Schriftums stellt sich der Hengst als klinisch inapparenter Keimträger in der Epidemiologie der kontagiösen equinen Metritis als bedeutender Überträger von *T. equigenitalis* dar. Da es bei infizierten Hengsten bisher keine eindeutigen Hinweise einer diagnostisch verwertbaren humoralen Reaktion des Immunsystems gibt, bleibt der kulturelle Nachweis des CEM-Erregers die einzige Möglichkeit, Keimträger zu ermitteln. Der bakteriologische Nachweis von *T. equigenitalis* aus Tupferproben der äußeren Genitale bereitet jedoch auf Grund der stark vorhandenen saprophytären Normalflora und der intermittierenden Ausscheidung von *T. equigenitalis* große Probleme. Der Nachweis des Erregers aus Vorsekret und Sperma bei negativen Untersuchungsergebnissen aus Tupferproben des äußeren Genitale (Eichel, Eichelgrube, Harnröhrenöffnung, Penisschaft, Präputium) führte wiederholt zu Spekulationen über eine mögliche Besiedlung der inneren Geschlechtsorgane des Hengstes (akzessorische Geschlechtsdrüsen, Hoden, Nebenhoden).



Den Verlauf einer *T. equigenitalis*-Infektion beim Hengst hinsichtlich der Erregerausscheidung, der serologischen und hämatologischen Reaktionen sowie die Kolonisationsorte von *Taylorella equigenitalis* im Organismus des Hengstes zu untersuchen, sind Ziel dieser Arbeit. Zur Lösung dieser Zielstellung wurden zwei Shetlandponyhengste mit *Taylorella equigenitalis* infiziert, die Erregerausscheidung über einen längeren Zeitraum verfolgt und nach Ablauf des Tierversuches postmortale Untersuchungen hinsichtlich der Kolonisation des Erregers im Genitaltrakt durchgeführt.

Die im Verlauf der Reisolationsversuche aufgetretenen Probleme des Erregernachweises führten zu der Entscheidung, Hybridomzelllinien, die gegen *Taylorella equigenitalis* gerichtete und diagnostisch einsetzbare monoklonale Antikörper produzieren, zu etablieren.

#### **4. Eigene Untersuchungen**

##### **4.1. Material und Methoden**

##### **4.1.1. Experimentelle Infektion von Ponyhengsten**

##### **4.1.1.1. Versuchstiere und Probenentnahme**

Als Versuchstiere standen zwei Shetlandponyhengste im Alter von 2 Jahren (Hengst 1) bzw. 1 Jahr (Hengst 2) sowie eine 6-jährige Shetlandponystute zur Verfügung, die in der allgemeinen und zuchthygienischen Untersuchung keine unphysiologischen Befunde erkennen ließen. Zur Bestätigung der Freiheit der Versuchstiere von *T. equigenitalis* wurden in Anlehnung an die Literatur dreimal im Abstand von mindestens 7 Tagen Tupferproben entnommen und bakteriologisch untersucht. Als Probenmaterial dienten bei beiden Versuchshengsten Tupferproben vom Penischaft, den Eichelgruben, der Harnröhre sowie das Vorsekret und Ejakulat, sofern diese gewinnbar waren.

Der Shetlandponystute wurden Tupferproben aus der Klitoris (Fossa glandis), der Zervix (Canalis cervicis) und dem Uterus (Corpus uteri) unter Verwendung des durch SELBITZ et al. (1988) beschriebenen Tupfergerätes entnommen.

Als Tupfer wurden sterile möglichst zarte Wattetupfer, die vor und nach der Probenentnahme in Stuarttransportmedium aufbewahrt wurden, benutzt. Das gewonnene Untersuchungsmaterial wurde innerhalb von 20 Minuten nach der Entnahme auf Nährböden ausgestrichen.

Die Entnahme des für die serologischen und hämatologischen Untersuchungen erforderlichen Blutes erfolgte aus der Vena jugularis in Zentrifugenröhrchen mit und ohne Heparinzusatz.

#### 4.1.1.2. Infektionsversuch

Der Infektionsversuch wurde in 2 unterschiedlichen Ansätzen durchgeführt.

##### Versuchsabschnitt I:

Die experimentelle Infektion der Shetlandponystute erfolgte mit dem streptomyzinsensitiven *T. equigenitalis*-Stamm "3904". Nachdem durch i.m. Applikation von 2 ml eines PGF2 $\alpha$ -Präparates (Enzaprost®) die Rosse induziert war, wurden der Stute über einen unter rektaler Kontrolle durch die Zervix in den Uterus eingeführten Gummikatheter 20 ml einer frisch auf  $1 \times 10^9$  bis  $1 \times 10^{10}$  kbE *T. equigenitalis* je ml eingestellten PBS-Lösung infundiert.

Ab 1. d. p. inf. erfolgte die Entnahme von Tupferproben und deren mikrobiologische Untersuchung mit dem Ziel der Reisolation von *T. equigenitalis*. Nach erfolgreichem Nachweis des Angehens der Infektion wurde der Stute am 31. d.p.inf. nach induzierter Rosse der Shetlandponyhengst 1 zum natürlichen Deckakt über einen Zeitraum von 6 Tagen zugeführt. Ab dem 4. Tag nach dem 1. Deckakt erfolgte beim Hengst die bakteriologische Untersuchung von Proben aus den bereits im Pkt. 4.1.1.1. genannten Entnahmeorten. Neben der bakteriologischen und klinischen Überwachung des Versuchshengstes 1 wurden weiterhin serologische und hämatologische Untersuchungen durchgeführt. Am 173. d.p.inf. wurde Ponyhengst 1 nach Betäubung durch Blutentzug getötet. Dem Tier wurden die inneren und äußeren Organe des Geschlechtsapparates (Penis mit akzessorischen Geschlechtsdrüsen, Hoden, Nebenhoden mit Samenleitern), Organe des Harnapparates (Harnblase, Harnleiter, Nieren) und ein Teil der den Harn- und Geschlechtsapparat drainierenden Lymphknoten entnommen. Die Teile der genannten Organsysteme wurden pathologisch-anatomischen, pathologisch-histologischen und bakteriologischen Untersuchungen unterzogen.

##### Versuchsabschnitt II:

Die experimentelle Infektion des Shetlandponyhengst 2 wurde unter Verwendung des streptomyzinresistenten *T. equigenitalis*-Stammes "Wien" durchgeführt. Dem Hengst wurden bei erigiertem Penis 5 ml einer frisch auf  $1 \times 10^9$  bis  $1 \times 10^{10}$  kbE *T. equigenitalis* je ml eingestellten PBS-Lösung mittels einer Knopfkanüle in die Urethra infundiert. Ab dem 3. Tag nach der Infektion wurden dem Tier Proben zur Reisolation von *T. equigenitalis* entnommen. Neben der bakteriologischen und klinischen Überwachung des Versuchshengstes 2 wurden weiterhin serologische und hämatologische Untersuchungen durchgeführt. Vom 240. d.p.inf. bis zum 319. d.p. inf. wurde das Tier ein- bis zweimal wöchentlich abgesamt. Am 351.

und 355. d.p.inf. wurde dem Versuchshengst 2 die nach mehrfach negativ verlaufenen bakteriologischen Untersuchungen als *T.-equigenitalis*-frei anzusehende Ponystute zum natürlichen Deckakt zugeführt und anschließend wie bereits im Pkt. 4.1.1.1. beschrieben bakteriologisch auf eine erfolgte Erregerübertragung untersucht. Am 433. d.p.inf. erfolgte nach Betäubung die Tötung des Hengstes durch Blutentzug und die wie bereits im Versuchsabschnitt I durchgeführten postmortalen Untersuchungen. Zusätzlich wurden die entnommenen Organe dem im Pkt. 4.1.1.7. beschriebenen immunhistologischen Erregernachweis unterzogen.

#### 4.1.1.3. Bakteriologische Untersuchungen

Für die bakteriologische Untersuchung der von den 3 Versuchstieren entnommenen Proben wurden folgende Nährmedien beimpft und anschließend mikroaerophil im Kerzentopf bei 37°C bebrütet:

- 10 %iger Pferdekochblutagar mit Zusatz von 300 µg L-Cystin pro ml Agar
- 10 %iger Pferdekochblutagar mit Zusatz von 300 µg L-Cystin und 200 µg Streptomycin pro ml Agar

Die Nährmedien wurden entsprechend der Streptomycinempfindlichkeit der in den in beiden Teilversuchen verwendeten *T.-equigenitalis*-Stämme eingesetzt, d.h. daß im ersten Infektionsversuch jede Probe ausschließlich auf 3 Pferdekochblutagarplatten ohne Antibiotikazusatz ausgestrichen wurde, während im zweiten Teilversuch jede Probe auf 3 Pferdekochblutagarplatten mit Streptomyzinzusatz angesetzt wurde. Beim Beimpfen der Nährmedien wurde der Tupfer intensiv auf einem Viertel der Platte eingerieben und anschließend mittels sterilem Glasstab ein Verdünnungsausstrich angefertigt. Von flüssigem Probenmaterial (Vorsekret, Ejakulat, Exsudat) wurde mit einer sterilen Pipette 0,1 ml des Materials auf eine Stelle der Platte getropft und nach dem Einziehen der Flüssigkeit in den Nährboden ein Verdünnungsausstrich angefertigt.

Die bakteriologische Untersuchung der postmortal entnommenen Organe wurde wie nachfolgend durchgeführt. Nach einem kurzen Abflammen der Organoberfläche wurde ein Schnitt in den zu untersuchende Organabschnitt geführt, die Schnittfläche direkt auf das Nährmedium aufgetupft und ein Verdünnungsausstrich angefertigt. Die Organe des Ponyhengstes 1 wurden auf folgenden Nährmedien untersucht:

- 4 Pferdekochblutplatten ohne Antibiotikazusatz
- je 2 Pferdekochblutplatten mit 15 µg/ml, 10 µg/ml bzw. 5 µg/ml Oxazillin

- je 2 Pferdekochblutplatten mit 6 µg/ml bzw. 3 µg/ml Lincomyzin
- je 2 Pferdekochblutplatten mit 10 µg/ml Oxazillin und 6 µg/ml Lincomyzin
- je 2 Pferdekochblutplatten mit 5 µg/ml Oxazillin und 3 µg/ml Lincomyzin

Die bakteriologische Untersuchung der Organe des Ponyhengstes 2 erfolgte auf jeweils 4 Pferdekochblutplatten mit Streptomyzinzusatz und 2 Pferdekochblutplatten ohne Antibiotikazusatz.

Die Nährmedien wurden beginnend 48 h nach dem Ansatz im ein- bis zweitägigen Abstand auf das Wachstum von Taylorellenkolonien überprüft. Von den verdächtigen Kolonien wurde zunächst eine Gramfärbung angefertigt. Beim Auftreten gramnegativer zarter Stäbchen bzw. kokkoider Bakterien erfolgte zur Gewinnung von Reinkulturen eine Subkultivierung mit täglicher Überprüfung auf Koloniewachstum. Zur endgültigen Identifizierung des Erregers diente die Koloniemorphologie, die Gramfärbung, die Oxidase- und Katalasereaktion sowie die OSA mit einem Kaninchenimmunserum.

#### **4.1.1.4. Hämatologische Untersuchungen**

Die hämatologischen Untersuchungen wurden unter Verwendung der durch CHRISTOPH und MEYER (1979) beschriebenen Methodik in der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig durchgeführt.

Das zu untersuchende Blut wurde in Heparin enthaltende Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Die Ermittlung der Erythrozyten- und Leukozytenzahl erfolgte unter Verwendung der Zählkammer nach Neubauer. Der zur Ermittlung des Differentialblutbildes angefertigte Blutausschlag wurde nach 60minütiger Methanolfixation nach Giemsa gefärbt und beurteilt. Die Hämoglobinbestimmung erfolgte entsprechend des DAB 9, D.L. nach der Hämiglobinzyanidmethode, der Hämatokrit wurde mit der Mikromethode bestimmt.

#### **4.1.1.5. Serologische Untersuchungen**

Die entnommenen Seren wurden in der SLA, dem HT, der KBR, der PHA und dem IFT auf das Vorkommen von spezifischen Antikörpern gegen *T. equigenitalis* untersucht.

Die SLA, HT und KBR wurde in Anlehnung an FRIEDRICH (1989) durchgeführt. Die Methodik hinsichtlich der Durchführung der PHA entspricht der von ULLRICH (1990) im Institut etablierten Technik. In diesen serologischen Untersuchungen wurden negative und positive Kontrollseren vom Pferd und Kaninchen mitgeführt. Als positives, homologes Serum diente ein durch ULLRICH und SELBITZ (1989) in Ponystuten hergestelltes Hyperimmunserum, als positives heterologes Immunserum das im Pkt. 4.1.2. beschriebene Kaninchenhyperimmunserum.

Der indirekte Immunfluoreszenztest wurde auf Grundlage der durch TAINTURIER et al. (1981b) beschriebenen Methode modifiziert durchgeführt. Als Antigen wurde das im Pkt. 4.1.3.1. beschriebene Vollantigen benutzt. Auf handelsübliche Multitestobjektträger (Ilmenauer Glaswerke GmbH) wurde je Testfläche 20 µl einer 1:32 mit Aqua bidest. verdünnten Antigenlösung aufgetropft. Nach dem Trocknen erfolgte eine einminütige Fixation mit Methanol, ein Spülen der Objektträger mit Aqua bidest. sowie ein abschließendes Trocknen. Auf die Testflächen wurden anschließend jeweils 20 µl eines 1:10 und eines 1:20 mit PBS verdünnten Serums aufpipettiert. Nach einer einstündigen Bebrütungszeit bei 37°C in einer feuchten Kammer wurde der Multitestobjektträger zweimal mit PBS und abschließend mit Aqua bidest. gewaschen. Auf den luftgetrockneten Objektträger wurden je Testfläche 20 µl eines 1:50 mit PBS verdünnten Kaninchen-Antipferd(H+L)-FITC-Konjugates aufgetropft. Nach einer einstündigen Bebrütungszeit bei 37°C in einer feuchten Kammer wurde der Objektträger wiederum zweimal mit PBS und abschließend mit Aqua bidest. gespült. Nach dem Trocknen erfolgte die Beurteilung der Reaktion unter dem Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe der Ölimmersion bei 1000facher Vergrößerung. Als Positivkontrolle wurden je Multitestobjektträger auf eine Testfläche 20 µl eines durch ULLRICH und SELBITZ (1989) in Ponystuten hergestellten Hyperimmunserums in einer Verdünnung von 1:80 aufgetragen. Als Negativkontrolle diente ein 1:20 verdünntes neonatales Fohlenserum, von dem pro Objektträger 20 µl auf eine Testfläche aufpipettiert wurden. Die Einteilung positiver Reaktionen erfolgte nach der Intensität der Fluoreszenz der Bakterien in Dreikreuz- bis Einkreuzreaktionen. Als positiver Titer wurde nach TAINTURIER et al. (1981b) eine Einkreuzreaktion ab einer Serumverdünnung von 1:20 angesehen. Diese im Doppelansatz durchgeführten Serumuntersuchungen dienten zunächst nur zum Screening der zu untersuchenden Serumproben. Traten dabei bei Serumverdünnungen von 1:20 positive Reaktionen auf, wurde das betreffende Serum nochmals zwecks Austitrieren in den Verdünnungsstufen 1:10 bis 1:1280 untersucht.

#### 4.1.1.6. Pathologisch-anatomische und histologische Untersuchungen

Beide Ponyhengste wurden am 173. Tag bzw. 433. Tag des Infektionsversuches nach Betäubung durch Blutentzug getötet. Es wurden die im Pkt. 4.1.1.3. genannten Organe des Harn- und Genitalapparates beider Hengste entnommen. Die pathologisch-anatomischen und histo-pathologischen Untersuchungen erfolgten im Institut für Veterinärpathologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig.

Die Organe wurden zunächst in 1:4 mit Wasser verdünnten Formalin fixiert, anschließend in Paraffin eingebettet und auf 5 µm Dicke geschnitten. Die Färbung der Gewebsschnitte erfolgte mit Hämalaun-Eosin.

#### 4.1.1.7. Immunhistologischer Erregernachweis

Der immunhistologische Nachweis von *T. equigenitalis* erfolgte im IFT mit Hilfe der Doppelmarkierungstechnik. Aus formalinfixiertem und paraffineingebetteten Gewebe- und Organmaterial des Ponyhengstes 2 wurden 5 µm dicke Schnitte hergestellt. Anschließend erfolgte die Entparaffinierung mit Xylol und der absteigenden Alkoholreihe. Die weitere Behandlung der Gewebe- und Organschnitte wurde wie folgt durchgeführt:

- Präparate 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer mit einem 1:100 in PBS verdünnten Ziegennormalserum inkubieren
- Objektträger zweimal 5 min. in PBS spülen
- Präparate 1 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer mit einem 1:100 verdünnten Hyperimmunserum gegen *T. equigenitalis* vom Kaninchen und dem 1:100 verdünnten mAk TF III 11E5 inkubieren
- Objektträger dreimal 5 min. in PBS spülen
- Präparate 1 h bei 37°C in feuchter Kammer mit einem 1:50 in PBS mit 1% Triton X-100 verdünnten Ziege-Anti-Kaninchen(H+L)-FITC-Konjugat und einem 1:50 in PBS verdünnten Ziege-Anti-Maus(H+L)-Rhodamin-Konjugat inkubieren
- Objektträger dreimal 5 min. in PBS spülen
- Schnitte 5 min. mit PBS und 0,01% Evans Blue gegenfärben
- Gewebeschnitte trocknen und einbetten in PBS gepufferter Gelatine (Verhältnis 1:9)

wurde mit Lysozym (0,3 mg/ml) bei 4°C über Nacht aufgeschlossen. Der Zentrifugation mit  $4 \times 10^5 g$  für 10 min. über schloß sich eine Behandlung des Pellets mit RNase (100 µg/ml) und DNase (100 µg/ml) bei 4°C über Nacht an. Nach der sich anschließenden Zentrifugation wurde das Pellet zweimal mit sterilem Aqua dest. gewaschen. Der Resuspendierung des Pellets in sterilem PBS folgte eine Ultraschallbehandlung im Eiswasserbad über ca. 10 sec. bis zum Vorliegen einer homogenen Antigensuspension sowie die Bestimmung des Proteingehaltes und eine Portionierung zu je 1 ml. Die Lagerung der Antigene 2 und 3 erfolgte bei -20°C. Das zur Immunisierung verwendete Vollantigen wurde stets frisch hergestellt.

#### 4.1.3.2. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der präparierten Antigene wurde nach der Methode von BRADFORD (1976) bestimmt. Von den zu untersuchenden Proben wurden in einer Mikrotiterplatte von einer 1:2 vorverdünnten Antigenlösung Verdünnungsreihen in PBS hergestellt (1:2 bis 1:4096). Zu den 130 µl Probenvolumen wurden anschließend 30 µl Bradfordreagenz (Bio-Rad) pipettiert und nach 5minütigen Schütteln die Adsorption bei 595 nm gemessen (Spektralphotometer SUMAL). Als Proteinstandard diente in PBS gelöstes Rinderserumalbumin.

#### 4.1.3.3. Immunisierung von Balb/c-Mäusen

Das in Tabelle 3 dargestellte Schema, einschließlich der applizierten Antigenmengen zur Immunisierung der ca. 3 Monate alten männlichen Balb/c-Mäuse, wurde nach den Empfehlungen von PETERS und BAUMGARTEN (1990) gewählt.

Die Applikation des Antigens erfolgte intraperitoneal unter Verwendung der im Pkt. 4.1.3.1. genannten Antigenpräparationen. Die Mäuse 1 und 2 erhielten das Antigen 1, die Mäuse 2 und 3 das Antigen 2 und die Mäuse 5 und 6 das Antigen 3 injiziert. Die Blutentnahme erfolgte unter Verwendung heparinisierter Kanülen und Spritzenmaterials. Das gewonnene Blut wurde in Eppendorfgefäße verbracht und sofort 10 min. bei 3000 U/min zentrifugiert. Unter Verwendung einer Mikrospritze wurde der Überstand abgenommen und in einem Eppendorfgefäß 1:5 mit sterilem PBS verdünnt und bei -20°C gelagert. Der Tierversuch wurde im Rahmen des Versuchsvorhabens "Herstellung monoklonaler Antikörper gegen *Taylorella equigeni-*

talis" als TVV 8/91 durch das Referat Lebensmittelüberwachung, Verbraucherschutz und Veterinärwesen im Regierungspräsidium Leipzig genehmigt.

Tab. 3: Vorbereitung von Balb/c-Mäusen zur Fusion

d.p.vacc.	Manipulation	Maus	Antigendosis/Maus
0.	Blutentnahme Priming	1 und 2	$10^7$ kbE in 100 $\mu$ l PBS, 100 $\mu$ l cFA
		3 und 4	180 $\mu$ g Protein in 100 $\mu$ l PBS, 100 $\mu$ l cFA
		5 und 6	100 $\mu$ g Protein in 100 $\mu$ l PBS, 100 $\mu$ l cFA
14.	Blutentnahme 1.Boosterung	1 und 2	$10^7$ kbE in 100 $\mu$ l PBS
		3 und 4	180 $\mu$ g Protein in 100 $\mu$ l PBS
		5 und 6	100 $\mu$ g Protein in 100 $\mu$ l PBS
21.	Blutentnahme 2.Boosterung	1 und 2	$10^6$ kbE in 50 $\mu$ l PBS
		3 und 4	90 $\mu$ g Protein in 50 $\mu$ l PBS
		5 und 6	50 $\mu$ g Protein in 50 $\mu$ l PBS
35.	Blutentnahme 3.Boosterung	1 und 2	$10^6$ kbE in 50 $\mu$ l PBS
		3 und 4	90 $\mu$ g Protein in 50 $\mu$ l PBS
		5 und 6	50 $\mu$ g Protein in 50 $\mu$ l PBS
70.	Blutentnahme 4.Boosterung	1 und 2	$10^6$ kbE in 50 $\mu$ l PBS
		3 und 4	90 $\mu$ g Protein in 50 $\mu$ l PBS
		5 und 6	50 $\mu$ g Protein in 50 $\mu$ l PBS
90.,110., 130.,142.,	Blutentnahme	1 und 2	
		3 und 4	
		5 und 6	
143.,144., 145.	Boosterung vor Fusion	1 und 2	$10^8$ kbE in 100 $\mu$ l PBS
146.	Fusion	1 und 2	
151.,152., 153.	Boosterung vor Fusion	3 und 4	100 $\mu$ g Protein in 100 $\mu$ l PBS
154.	Fusion	3 und 4	
207.	Blutentnahme	5 und 6	
208.,209., 210.	Boosterung vor Fusion	5 und 6	180 $\mu$ g Protein in 100 $\mu$ l PBS
211.	Fusion	5 und 6	



#### 4.1.3.4. ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen *T. equigenitalis*

##### 4.1.3.4.1. Lösungen

PBS: 8,0 g NaCl, 0,1 g KCl, 0,1 g KHPO<sub>4</sub>, 2,3 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ad 1000 ml Aqua dest., pH 7,4

Substratpuffer: (1) 2,27 g Zitronensäure·H<sub>2</sub>O ad 100 ml Aqua dest.

(2) 3,56 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O ad 100 ml Aqua dest.

49 ml Lösung (1) und 51 ml Lösung (2), auf pH 5,0 einstellen

Substratlösung. 20 mg Orthophenylendiamin, 50 ml Substratpuffer, 25 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

##### 4.1.3.4.2. ELISA-Durchführung

Die Kontrolle der Dynamik der Serumantikörper der immunisierten Balb/c-Mäuse erfolgte im ELISA. Dafür wurde Bakterienmaterial von Kochblutplatten nach einer Bebrütungszeit von 3 Tagen in PBS abgeschwemmt und mittels Photometer bei 600 nm auf eine optische Dichte von ca.  $1 \times 10^{10}$  kbE/ml eingestellt. Die Bakterien wurden durch eine einstündige Erhitzung auf 60°C im Wasserbad inaktiviert. Das Antigen wurde portioniert und bei -20°C gelagert. Zum Coaten der Mikrotiterplatten wurden pro Kavität 50 µl einer 1:32 mit Aqua bidest. verdünnten Antigenlösung einpipettiert und die Platten bei 37°C im Brutschrank getrocknet. Der ELISA zur Bestimmung der Antikörpertiter der immunisierten Balb/c-Mäuse wurde wie folgt durchgeführt:

- 200 µl Blockpuffer(PBS mit 1% Gelafusal) pro Kavität einpipettieren, 1h bei 37°C inkubieren
- Zweimal 3 min mit 200 µl Waschpuffer(PBS mit 0,05% Tween 20) spülen
- Durchführung der Serumverdünnung in PBS beginnend von 1:20 bis 1:40960, 1h bei 37°C inkubieren
- Dreimal 3 min mit 200 µl Waschpuffer spülen
- Einpipettieren von 50 µl Ziege-Anti-Maus(H+L)-POD-Konjugat 1:6000 in PBS verdünnt, 1h bei 37°C inkubieren
- Dreimal 3 min mit 200 µl Waschpuffer spülen
- Einpipettieren von 50 µl Substratlösung je Kavität,
- Substratlösung 30 min bei 37°C inkubieren
- Reaktion mit 50 µl 4n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> stoppen
- Messen der Extinktion bei 495 nm (Spektralphotometer SUMAL)

Der Grenztiter für die Mäuseseren wurde in jeder Serumverdünnungsstufe aus der Summe des Mittelwertes der Extinktion von 56 untersuchten negativen Mäuseseren und der Standardabweichung in jeder Verdünnungsstufe multipliziert mit dem Faktor 2,5 festgelegt.

#### 4.1.3.5. Herstellung von Hybridomakulturen

##### 4.1.3.5.1. Lösungen und Medien

Hypoxanthin-Thymidin-Lösung (HT-Lösung, 50-fach): 19 mg Thymidin, 68 mg Hypoxanthin in 50 ml Aqua bidest bei 37°C-56°C lösen, mit NaOH auf pH 7,0 einstellen, ad 100 ml Aqua bidest., sterilfiltrieren, portioniert bei - 20°C lagern

Aminopterin-Lösung (100-fach): 1,76 mg Aminopterin in 50 ml Aqua bidest lösen, mit NaOH auf pH 7,0 einstellen, ad 100 ml Aqua bidest., sterilfiltrieren, portioniert bei - 20°C lagern

Penizillin-Streptomyzin-Lösung (PS-Lösung, 1000-fach):  
25,6 g Streptomyzinsulfat, 6,0 g Penizillin G ad 100 ml Aqua bidest., sterilfiltrieren, portioniert bei - 20°C lagern

MPM-Medium: 5 ml L-Glutamin-Lösung(200mM, Gibco), 5 ml Na-Pyruvat-Lösung(100mM, Gibco), 0,5 ml PS-Lösung, 50 ml FKS, 500 ml RPMI 1640

HAT-Medium: 10,0 ml HT-Lösung(50-fach), 5 ml Aminopterin-Lösung (100-fach), 5 ml L-Glutamin-Lösung(200mM, Gibco), 50 ml FKS  
5 ml Na-Pyruvat-Lösung(100mM, Gibco), 0,5 ml PS-Lösung  
500 ml RPMI 1640

HT-Medium: 10,0 ml HT-Lösung(50-fach)  
0,5 ml PS-Lösung, 5 ml L-Glutamin-Lösung(200mM, Gibco),  
5 ml Na-Pyruvat-Lösung(100mM, Gibco), 50 ml FKS, 500 ml RPMI 1640

Konditioniertes Medium: 1 ml L-Glutamin-Lösung(200mM, Gibco)  
1 ml Na-Pyruvat-Lösung(100mM, Gibco), 0,5 ml PS-Lösung  
10 ml FKS, 10 ml CB-F7-Kulturüberstand, ad 100 ml RPMI 1640

Cool-down-Medium: 50 ml FKS ad 100 ml RPMI 1640

Freezing-Medium: 20 ml Dimethylsulfoxid ad 100 ml RPMI 1640

#### 4.1.3.5.2. Myelomzellen

Die Herstellung der gegen *Tylorella equigenitalis* Antikörper produzierenden Hybridomazelllinien erfolgte im Zelllabor des Institut für Virologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Als Fusionspartner der Milzzellen wurden dabei zwei unterschiedliche Myelomzelllinien verwendet. Die durch KÖHLER und MILSTEIN (1975) etablierte murine Myelomzelllinie P3X63-Ag8, zur Verfügung gestellt durch Dr. Briese, Institut für Virologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin sowie die durch GRUNOW et al. (1988) etablierte Heteromyelomzelllinie CB-F7, zur Verfügung gestellt durch Dr. med. vet. Hlinak, Institut für Geflügelkrankheiten der Veterinärmedizinischen Fakultät der Humboldt-Universität Berlin, kamen zum Einsatz.

Die Vermehrung der Myelomzellen erfolgte anfangs in 250-ml-Plastikkulturgefäßen. Die zur Fusion eingesetzten Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase, d.h. in einem Bereich von  $10^4$  bis  $10^5$  Zellen/ml Medium gehalten. Bei Überschreiten dieser Zelldichte erfolgte ein Verdünnen auf eine adäquate Anzahl neuer Kulturgefäße.

#### 4.1.3.5.3. Splenektomie und Aufbereitung der Milzzellen

Die zur Milzentnahme vorgesehene Maus wurde von 3. bis 1. Tag vor der geplanten Fusion täglich nach dem im Pkt. 4.1.3.3. dargestellten Schema intra-peritoneal geboostert. Nach der Tötung des Tieres mittels Ether erfolgte die Entnahme der Milz unter aseptischen Kautelen. Zur Isolierung der Milzzellen wurde das Organ unter Verwendung steriler an einem Ende beidseitig angeschliffener Objektträger in Plastikkulturschalen zerrieben. Die Einzelzellsuspension wurde in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert und 5 min. im Brutschrank zwecks Sedimentation zurückgebliebener Kapsel- und Stützgewebsreste verbracht. Nach dem Pelletieren des Überstandes (2000 U/min., 10 min.) erfolgte das Lysieren der im Pellet enthaltenen Erythrozyten durch Zugabe von 1 ml steriler, 0,83 %iger  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung unter vorsichtigem Resuspendieren des Pellets. Nach einer Einwirkzeit von 2 min erfolgte das Aufschichten der Zellsuspension auf 10 ml vorgewärmtes FKS und eine anschließende Pelletierung (1000 U/min, 10 min). Nach Entfernen des Überstandes schlossen sich 3 Waschschrte unter Verwendung serumfreien RPMI-1640-Mediums an. Die Zellen wurden abschließend in 3 ml

serumfreiem RPMI-1640-Medium resuspendiert und unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

#### **4.1.3.5.4. Aufarbeitung der Myelomzellen**

Zeitgleich mit der Vorbereitung der Milzzellen wurden die Myelomzellen in ihrem Kulturmedium resuspendiert, in 50-ml-Zentrifugenröhren überführt, zentrifugiert (1500 U/min, 10min), dreimal mit serumfreiem RPMI-1640-Medium gewaschen und in 5 ml serumfreiem Medium resuspendiert. Abschließend erfolgte die Bestimmung der zur Verfügung stehenden Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer.

#### **4.1.3.5.5. Fusion von Myelom- und Milzzellen**

Zu den zur Fusion vorbereiteten Milzzellen wurden nun Myelomzellen im Verhältnis 1:1 zugesetzt. Das Zellgemisch wurde bei 1750 U/min über 5 min sedimentiert, der gesamte Überstand restlos entfernt und das erhaltene Pellet in sich selbst bis zum Freisein von Klümpchen resuspendiert. Die Fusion erfolgte unter gleichmäßiger Zugabe von 1 ml 44,4 %igem PEG über einen Zeitraum von 1 Minute. Anschließend wurde die PEG-Konzentration durch Zugabe von 1,5 ml serumfreiem RPMI-1640-Medium während 1 min und darauffolgend von 3 ml über 2 Minuten verringert. Die Zellfusion wurde durch Zugabe von 6 ml MPM während 2 Minuten und abschließender Sedimentation der Zellen (1000 U/min, 10 min) beendet. Die Resuspendierung des erhaltenen Pellets erfolgte durch mehrmalige Zugabe von HAT-Medium über einen Zeitraum von 30 Minuten unter vorsichtigem Schwenken des Röhrchens. Die fusionierten Zellen wurden in 12 mit 150 µl HAT-Medium pro Vertiefung versehene 96-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät.

#### **4.1.3.5.6. Kultivierung von Hybridomakulturen**

Die nach der Fusion angelegten Kulturen wurden 14 Tage unter HAT-Medium gehalten, anschließend erfolgte die Kultivierung in HT-Medium. Die Kulturen wurden zunächst jeden 3. Tag mit frischem Medium versorgt und täglich makroskopisch auf Kontaminationen kontrolliert. Wenn in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten der Mediumspiegel die 250-µl-Grenze erreicht hatte, erfolgte ein

Mediumwechsel. Dieser Mediumwechsel wurde bis zum ersten Test auf antikörperproduzierende Klone zweimal durchgeführt. Nach dem Erreichen einer gewissen Klonegröße wurden die im ELISA positiven Klone in einen Kulturnapf einer 24-Loch-Zellkulturplatte umgesetzt und mit 1 ml HT-Medium versehen. Nach dem erfolgreichen Aufwachsen der umgesetzten Klone erfolgte die Testung der Überstände von 45 verschiedenen Zelllinien im Screening-Westernblot und die Selektion der zu klonierenden Zellen. Nicht selektierte Zellen wurden wie im Pkt. 4.1.3.5.9. beschrieben eingefroren.

#### 4.1.3.5.7. Testen auf die Produktion spezifischer Antikörper

Der erste Test zum Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen *T. equigenitalis* wurde nach der Ausbildung von Klonen mit ca. 50-100 Zellen (10 bis 14 Tage nach der Fusion) durchgeführt.

Als Testsystem diente der unter Pkt. 4.1.8.3. beschriebene ELISA, in dem 50 µl steril entnommenen Kulturüberstandes auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper untersucht wurden. Die Tests wurden wöchentlich wiederholt.

#### 4.1.3.5.8. Klonieren

Das Klonieren wurde mit dem Ziel durchgeführt, genetisch einheitliche und hinsichtlich Wachstum und Antikörperproduktion stabile Hybridomzelllinien zu selektieren. Die erste Klonierung wurde nach der Endverdünnungsmethode durchgeführt, indem 100 µl Hybridomasuspension in konditioniertem Kulturmedium verdünnt und anschließend 50 µl der Verdünnungsstufen  $10^{-1}$  bis  $10^{-4}$  in eine mit 100 µl pro Vertiefung versehene Mikrotiterplatte einpipettiert wurden.

Zur zweiten Klonierung wurde nach einer Testung der ersten Klonierung derjenige Klon mit der größten ELISA-Extinktion ausgewählt. Nach Resuspendierung und Zählen der Zellen wurde 2 Zellen pro Vertiefung einer bereits mit 100 µl konditioniertem Kulturmedium versehenen Mikrotiterplatte ausgesät.

Zur Klonierung wurden die Klone TF I 10D2, TF III 11E5, TF III 11B5, TF III 10G5, TF II 8D4, TF III 7D4, TF III 3G3 und TF III 3E8 auf der Grundlage ihrer im Screening-Westernblot gezeigten Fähigkeiten, unterschiedliche Proteine von *T. equigenitalis* zu erkennen, ausgewählt.

#### **4.1.3.5.9. Einfrieren von Hybridomzellen**

Einzufrierende Hybridomzellen wurden zunächst 5 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes erfolgte die Resuspendierung des Pellets in 1 ml Cool-down-Medium sowie eine einstündige Lagerung der in Kryoröhrchen einpipettierten Zellen auf Eis. Anschließend wurde dem Kryoröhrchen noch 1 ml Freezing-Medium zugegeben. Danach wurden die Röhrchen in Zellstoff verpackt und für 1 Woche bei - 70°C gelagert. Die Dauerlagerung wurde anschließend in flüssigem Stickstoff weitergeführt.

#### **4.1.3.5.10. Produktion von mAK**

Die Produktion größerer Mengen mAK-haltiger Überstände erfolgte in 50-ml-Plastikkulturgefäßen unter Verwendung von MPM-Medium. Die Hybridomzellen wurden ohne Mediumwechsel gehalten. Nach Erreichen eines Mediumspiegels von ca. 30 ml wurde die Zufuhr von frischem Zellkulturmedium eingestellt und bis zum Absterben der Zellen gewartet. Der Überstand wurde nach 10minütiger Zentrifugation bei 2000 U/min von Zellen und Detritus getrennt und anschließend portioniert bei -20°C gelagert.

### **4.1.3.6. Methoden zur Charakterisierung monoklonaler Antikörper**

#### **4.1.3.6.1. Subklassenbestimmung**

Die Bestimmung der Immunglobulinsubklassen erfolgte mit dem im Pkt. 4.1.3.4. beschriebenen ELISA in nachstehender Modifikation. Die Hybridomüberstände wurden je nach ihrem ELISA-Titer unverdünnt bzw. 1:100 verdünnt eingesetzt. Nach der Inkubation der Überstände erfolgte eine dreimalige Wäsche der Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit PBS. Anschließend wurden 50 µl von 1:500 verdünntem Antiimmunglobulinklasseserum von Kaninchen zugesetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der dreimaligen Wäsche mit PBS wurde die Mikrotiterplatte mit je 50 µl eines 1:4000 verdünnten Ziege-Anti-Kaninchen-POD-Konjugates inkubiert. Die weitere Behandlung der Mikrotiterplatte (Substratreaktion, Auswertung) erfolgte wie im Pkt. 4.1.8.3. dargestellt.

#### 4.1.3.6.2. Enzym-Linked-Immuno-Assay (ELISA)

Die verschiedenen mAk wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, andere *T. equigenitalis*-Stämme im ELISA zu erkennen, überprüft. In der Tabelle 4 sind die im ELISA getesteten *T. equigenitalis*-Isolate aufgeführt.

Tab. 4: Zusammenfassung der im ELISA gegen mAk getesteten Taylorellenisolat

Stammbezeichnung	Herkunft
<i>T. equigenitalis</i> /Wien, Immunisierungsstamm	Veterinärmedizinische Universität Wien
<i>T. equigenitalis</i> /NCTC 11184, Referenzstamm	National Centre of Type Culture, London
<i>T. equigenitalis</i> I/3 <i>T. equigenitalis</i> II/49 <i>T. equigenitalis</i> III/8 <i>T. equigenitalis</i> IV/17 <i>T. equigenitalis</i> V/39	Veterinärmedizinische Universität Wien, Vertreter der durch LAPAN (1990) ermittelten 5 verschiedenen Restriktionsenzymmuster
<i>T. equigenitalis</i> /3904	Bezirksinstitut für Veterinärwesen Karl-Marx-Stadt
<i>T. equigenitalis</i> /D105	Bezirksinstitut für Veterinärwesen Potsdam
<i>T. equigenitalis</i> /BW26	Landesuntersuchungsamt Aulendorf, 1990 isoliert
<i>T. equigenitalis</i> /2729 <i>T. equigenitalis</i> /2891	Landesuntersuchungsamt Bad Langen- salza, 1991 isoliert

Zur Abklärung möglicher Kreuzreaktion der mAk wurde diese auch gegen die im Pkt. 4.1.2. genannten Bakterienstämme im ELISA getestet.

Die Antigenaufbereitung und das Beschicken der Mikrotiterplatten mit den verschiedenen Antigenen erfolgte in gleicher Art und Weise wie bereits im Pkt. 4.1.3.4. beschrieben. Die mAk wurden in Abhängigkeit vom Überstandstiter unverdünnt oder 1:10 verdünnt eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde das von der Maus 1 nach der Euthanasie entnommene Immunsereum in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt, als Negativkontrolle der unverdünnte Überstand von Kufu 2 produzierenden Hybridomzellen.

Die weitere Durchführung des ELISA erfolgte wie im Pkt. 4.1.3.4. bereits beschrieben.

#### **4.1.3.6.3. Indirekter Immunofluoreszenztest**

Die Eignung der mAK zur Identifizierung von *T. equigenitalis* wurde auch im IFT getestet. Die Antigenbeschichtung der Multitestobjektträger erfolgte wie im Pkt. 4.1.4 dargestellt. Zur Ermittlung der IFT-Titer wurde die Überstände 1:10 bis 1:1280 mit PBS verdünnt. Die antigenbeladenen Multitestobjektträger wurden 1 h bei 37°C mit je 20 µl des verdünnten Überstandes pro Testfläche in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach einer Wäsche mit PBS und mit Aqua bidest. wurden die Objektträger getrocknet und anschließend mit 20 µl eines 1:100 verdünnten Ziege-Anti-Maus(H+L)-Rhodaminkonjugat pro Testfläche unter gleichen Bedingungen inkubiert. Die Objektträger wurden wiederum mit PBS und abschließend mit Aqua bidest. gespült, getrocknet und mikroskopisch mit Hilfe der Ölimmersion bei 1000facher Vergrößerung auf das Vorhandensein spezifischer Fluoreszenzen untersucht.

#### **4.1.3.6.4. Immunoblot**

##### **4.1.3.6.4.1. Chemikalien und Lösungen**

Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung: 146 g Acrylamid, 4 g N,N'-Methylen-bis-acrylamid, Aqua bidest. ad 500 ml

Trenngelpuffer: 90,83 g Trishydroxymethylaminomethan, 2,0 g SDS ad 500 ml  
Aqua bidest., pH 8,8 mit HCl einstellen

Sammelgelpuffer: 30,28 g Trishydroxymethylaminomethan, 2,0 g SDS ad 500 ml  
Aqua bidest., pH 6,8 mit HCl einstellen

Trenngellösung(17,5%): 18 ml Trenngelpuffer, 39 ml Acrylamid-Bis-Lösung  
18 ml Aqua bidest., 50 µl TEMED, 104 µl Ammoniumpersulfat(10%ig)

Sammelgellösung(6%): 5 ml Sammelgelpuffer, 3 ml Acrylamid-Bis-Lösung  
12 ml Aqua bidest., 60 µl TEMED, 30 µl Ammoniumpersulfat(10%ig)

Kathodenpuffer(5x): 15,14 g Trishydroxymethylaminomethan, 72,1 g Glycin  
5,0 g SDS, ad 1000 ml Aqua bidest.

Anodenpuffer: 30,28 g Trishydroxymethylaminomethan, ad 1000 ml Aqua bidest.  
pH 8,4 mit HCl einstellen



Transferpuffer: 9,08 g Trishydroxymethylaminomethan, 43,26 g Glycin  
600 ml Methanol, ad 3000 ml Aqua bidest.

Probenpuffer: 1,0 g SDS, 3,0 g EDTA, 10,0 mg Bromphenolblau  
20 ml Glycerin(87%ig), 2,5 ml Sammelgelpuffer ad 100 ml Aqua bidest.

Ponceau S: 200 mg Ponceau S ad 100 ml 3%iger Perchlorsäure, vor Gebrauch 1:5  
mit 10%iger Essigsäure verdünnen

Entfärbelösung: 0,36 g Trishydroxymethylaminomethan ad 100 ml Aqua dest.  
pH 7,0 mit HCl einstellen, 20 ml Methanol ad 100 ml Tris-HCl

Waschpuffer: 0,9 g NaCl, 0,1 ml Tween 20, ad 100 ml Aqua dest.

Blockpuffer: 0,9 g NaCl, 1,0 g BSA, ad 100 ml Aqua dest.

Konjugatverdünnungspuffer: 0,6 g Trishydroxymethylaminomethan  
ad 100 ml Aqua dest, pH 8,0 mit HCl einstellen

AP-Substratpuffer: 12,1 g Trishydroxymethylaminomethan  
0,2 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ad 500 ml Aqua dest., pH 8,0 mit HCl einstellen

AP-Substrat: (1) 120 mg Fast Red Tr Salz(Sigma) ad 20 ml AP-Substratpuffer  
(2) 8,0 mg Naphtol-AS-MX-Phosphat ad 20 ml Aqua dest.  
Lösung (1) und (2) unmittelbar vor Gebrauch vereinigen und filtrieren

#### 4.1.3.6.4.2. SDS-PAGE

Drei Abstandhalter von 1,5 mm Dicke wurden an den Seiten und unten mit Hilfe von Schraubklammern zwischen Glasplatten eingeklemmt. Die Abdichtung der Gelkammer erfolgte mit heißer 1 %iger Agaroselösung. Die aufrecht gerichtete Gelkammer wurde zunächst bis in eine Höhe von ca. 13 cm mit Trenngellösung gefüllt. Zum Erzielen einer glatten Trenngeloberfläche wurde die Trenngellösung mit Aqua dest. vorsichtig überschichtet. Nach dem Abschluß der Polymerisation des Trenngels erfolgte das Ansetzen der Sammelgellösung, die nach dem Entfernen des überschichteten Aqua dests. in die Gelkammer einpipettiert wurde. Der anschließend sofort eingesetzte Probenkammerkamm wurde nach Abschluß der Polymerisation des Sammelgels wieder entfernt. Nach dem Entfernen des unteren Distanzhalters wurde die Gelkammer in die mit Anodenpuffer gefüllte untere Pufferkammer eingesetzt.

Die Charakterisierung der mAK im Immunoblot erfolgte unter Verwendung des im Pkt. 4.1.3.1. beschriebenen Vollantigens. Dieses Antigen wurde im Verhältnis 2:3 mit Probenpuffer versetzt und 3 min auf 100°C erhitzt. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein Low Range Prestained SDS-PAGE Marker (BIO-RAD) benutzt.

Nach dem Auftragen des Markers und der vorbereiteten Antigenlösung wurde die

obere Pufferkammer befestigt und mit Kathodenpuffer gefüllt. Die Trennung erfolgte bei 35 mA bis zum Erreichen des unteren Gelrandes durch die Bromphenolblaufront.

#### 4.1.3.6.4.4. Immunoblot

Nach Beendigung des Elektrophoreselaufes wurde das Polyacrylamidgel aus der Elektrophoresekammer entnommen, auf mit Transferpuffer getränktes doppel-lagiges Filterpapier gelegt und luftblasenfrei mit einem befeuchteten NC-Blatt abgedeckt. Das wiederum mit 2 Lagen feuchten Filterpapier bedeckte NC-Blatt wurde abschließend zusammen mit dem Gel zwischen 2 Schwämmchen in die Plastikhalterung einer Transferkammer eingesetzt. Der Elektrodenanschluß erfolgte so, daß das Polyacrylamidgel kathodenseitig und das NC-Blatt anodenseitig lagen. Der Transfer wurde über 5 h bei 200 mA durchgeführt.

Nach Beendigung des Westernblots wurde die Bahn mit den Molekulargewichtsmarkern abgeschnitten und zwischen Filterpapier getrocknet. Das übrige NC-Blatt wurde mittels Ponceau S angefärbt, anschließend mit einer Skalpellklinge in 4 mm breite Streifen geschnitten und in Blotkammern gelegt.

Nach der Entfärbung der NC-Streifen mit Entfärbelösung erfolgte eine zweimalige Wäsche der Streifen mit Waschpuffer, dem sich eine einstündige Inkubation mit Blockpuffer anschloß. Danach wurden die NC-Streifen über Nacht mit den mAK-haltigen Überständen und dem Mausserum (mAK unverdünnt bzw. 1:5 bis 1:10 verdünnt, Serum 1:1000 verdünnt) bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dreimaligen Spülen mit Waschpuffer wurden die NC-Streifen 1 h mit einem 1:1500 mit Konjugatverdünnungspuffer verdünnten Ziege-Anti-Maus(H+L)-AP-Konjugat bei Raumtemperatur unter leichten Schütteln inkubiert. Nach einer abschließenden dreimaligen Wäsche der NC-Streifen wurden die Streifen mit AP-Substrat bis zum deutlichen Sichtbarwerden von Proteinbanden unter Schwenken inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion sowie das Waschen der NC-Streifen erfolgte mit Aqua dest.

#### 4.1.3.6.4.5. Bestimmung der Molekulargewichte

Die Bestimmung der relativen Molekulargewichte der auf den NC-Streifen erkannten Proteine erfolgte durch Vergleich der Wanderungsfaktoren ( $R_f$ ) dieser Banden mit denen der Markerproteine. Die  $R_f$ -Werte ergaben sich aus dem Quotient, der

aus dem Verhältnis der Wanderstrecke einer Bande zur Gesamtlaufstrecke gebildet wird. Mit Hilfe der Rf der Markerproteine und dem Logarithmus der Molekülmasse konnte eine Eichkurve erstellt werden, aus der der Logarithmus der Molekülmasse der erkannten Proteine mit Hilfe deren Rf-Werte abgelesen werden konnte.

## 4.2. Ergebnisse

### 4.2.1. Ergebnisse des bakteriologischen Erregernachweises

#### Versuchsabschnitt I:

Nach der intrauterinen Infektion der Ponystute konnte der Erreger bereits am Tage danach aus dem Uterusexsudat reisoliert werden.

*T. equigenitalis* wurde bei den im Abstand von einem bis 3 Tagen durchgeführten Probenentnahmen bis zum 31. d.p.inf. aus Klitoris-, Zervix- und Uterustupferproben sowie aus dem Uterusexsudat bzw. Uterusspülproben angezüchtet.

Nach dem Decken der infizierten Ponystute (31. d.p.inf.) durch den Ponyhengst 1 konnte der Erreger ab dem 4. d.p.inf. aus den entnommenen Proben vom Ponyhengst reisoliert werden. Der Nachweis des Erregers gelang dabei aus allen 5 Probenmaterialien, die höchste Nachweisquote wurde aus dem Vorsekret erzielt. Der Erreger konnte im Zeitraum vom 4. bis 75. d.p.inf. regelmäßig isoliert werden. Dabei war eine starke Reduktion der Anzahl der auf den Nährmedien wachsenden kleinen wie großen *T.-equigenitalis*-Kolonien zu verzeichnen. Vom 83. d.p.inf. bis zum 147. d.p.inf. gelang es lediglich, mikroskopisch in Grampräparaten zwischen stark vertretenen coryneformen Keimen vereinzelt, morphologisch für *T. equigenitalis* sprechende Bakterien (gramnegative zarte Stäbchen bzw. gramnegative Kokkoide) nachzuweisen. Die zur Identifizierung notwendigen Reinkulturen konnten über die angelegten Subkulturen nicht erhalten werden. Die am 161. und 173. d.p.inf. durchgeführten bakteriologischen Untersuchungen verliefen wieder positiv. Hier traten ab 7. Bebrütungstag nur einzelne kleine Kolonien auf. Diese lieferten während der 4. Subkultivierung wieder große und kleine Kolonien. Nach dem Verschwinden des großen Kolonietypes bereiteten die ebenfalls auf Kochblutplatten sehr langsam wachsenden coryneformen Keime große Schwierigkeiten bei der Erzielung von Reinkulturen aus dem kleinen Kolonietyp von *T. equigenitalis*. Einen zusammenfassenden Überblick über den Verlauf der bakteriologischen Untersuchungen bei Ponyhengst 1 gibt die Tabelle 5.

Tab. 5: Reisolation von *T. equigenitalis* bei einem experimentell infizierten Ponyhengst (Tier 1)

d.p.inf.	PS	HR	EG	VS	Eja
- 34.	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
- 14.	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
- 1.	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
4.	+	+	+	+	/
6.	+	+	/	/	/
8.	+	Ø	Ø	+	/
11.	+	Ø	+	+	+
13.	+	+	+	+	/
15.	Ø	Ø	Ø	+	/
18.	+	Ø	+	Ø	/
20.	+	Ø	+	+	/
22.	+	+	+	+	/
25.	+	+	+	+	/
27.	+	Ø	+	+	/
75.	Ø	+	+	+	/
83.	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
91.	v.	Ø	v.	Ø	/
110.	Ø	Ø	Ø	v.	/
131.	Ø	v.	v.	Ø	/
138.	v.	v.	v.	v.	/
147.	Ø	Ø	v.	Ø	/
161.	Ø	/	+	Ø	/
173.	Ø	Ø	Ø	+	+

Legende: Ø Erregernachweis negativ

+ Erregernachweis positiv

v Mikroskopischer Nachweis verdächtiger Kulturen

/ keine Probenentnahme

## Versuchsabschnitt II:

Das erfolgreiche Angehen der Infektion beim Ponyhengst 2 konnte durch positive Ergebnisse in der bakteriologischen Untersuchung der ab dem 3. d.p.inf. entnommen Proben nachgewiesen werden. Dabei wurde bis zum 21. d.p.inf. ein stetiger Rückgang der auf den Nährböden gewachsenen *T. equigenitalis*-Kolonien beobachtet. Auffällig war, daß ab dem 17. d.p.inf. keine großen Kolonievarianten mehr auftraten. Vom 3. d.p.inf. bis zum 14. d.p.inf. wurden sowohl kleine wie auch große Kolonien beobachtet, wobei letztere bereits nach 48 h Bebrütungszeit, erstere erst zwischen dem 6. bis 8. Bebrütungstag sichtbar wurden. Ab dem 17. d.p.inf. traten nur noch kleine, erst ab 6. bis 8. Bebrütungstag sichtbare Kolonien auf. In der 3. Subkultivierung dieser kleinen Kolonien wurden wieder große und kleine Kolonievarianten registriert. Vom 24. d.p.inf. bis zum 84. d.p.inf. sowie vom 131. bis zum 240. d.p.inf. verliefen alle Versuche, *T. equigenitalis* zu reisolieren, negativ. Am 260. und 289. d.p.inf. sowie am 367. und 386. d.p.inf. konnten in der bakteriologischen Untersuchung der Tupferproben aus der Eichelgrube in Grampräparaten, welche von morphologisch verdächtigen Kolonien des Originalausstriches angefertigt wurden, zwischen stark vertretenen coryneformen Keimen vereinzelt gramnegative zarte Stäbchen bzw. kokkoide Bakterien nachgewiesen werden. Da jedoch die daraufhin angelegten Subkulturen zur Gewinnung der für die endgültige Identifizierung notwendigen Reinkulturen von *T. equigenitalis* nicht erfolgreich waren, konnte lediglich ein Verdacht ausgesprochen werden. Vom 333. d.p.inf. bis zum 355. d.p.inf. sowie am 398. d.p.inf. gelangen wieder vollständige Erregernachweise, d.h. der Erreger wurde morphologisch im Grampräparat sowie nach Subkultivierung biochemisch und serologisch identifiziert. Dabei konnten nur kleine, ab dem 8. Bebrütungstag sichtbare Kolonien beobachtet werden. Bei der Subkultivierung dieser Kolonien traten in der 3. Subkultur am 5. Inkubationstag vereinzelt, in der 4. Subkultivierung ab 3. Inkubationstag vermehrt große Kolonie auf.

Die in den Proben stark vertretenen coryneformen Keime führten auf Grund ihres massenhaften Auftretens und der dem kleinen Kolonietyp von *T. equigenitalis* gleichen Wachstumsgeschwindigkeit und ähnlichen Koloniemorphologie zu einer starken Behinderung der bakteriologischen Untersuchung auf *T. equigenitalis* in den Phasen des Infektionsversuches, in denen keine großen Kolonietypen mehr im Originalausstrich auftraten.

Da es sich bei diesem Versuchstier 2 zu Beginn des Versuches um ein noch nicht geschlechtsreifes Tier handelte (erstes Ejakulat spermienfrei), gelang es auf Grund fehlender oder geringer Libido sexualis bis zum 159. d.p.inf. nur einige Vorsekret- bzw. Ejakulatproben zu entnehmen.

Ein Überblick über den Verlauf der bakteriologischen Untersuchungen bei Ponyhengst 2 zum Nachweis von *T. equigenitalis* gibt Tabelle 6.

Tab. 6: Reisolation von *T. equigenitalis* bei einem experimentell infizierten Ponyhengst (Tier 2)

d.p.inf.	PS	HR	EG	VS	Eja
- 16.	Ø	Ø	Ø	/	/
- 9.	Ø	Ø	Ø	/	/
- 2.	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
3.	Ø	Ø	+	+	/
7.	Ø	Ø	+	+	/
10.	Ø	Ø	+	/	/
14.	Ø	Ø	+	/	/
17.	Ø	Ø	+	/	/
21.	Ø	Ø	+	/	/
24.	Ø	Ø	Ø	/	/
31.	Ø	Ø	Ø	/	/
35.	Ø	Ø	Ø	/	/
42.	Ø	Ø	Ø	/	/
49.	Ø	Ø	Ø	/	/
56.	Ø	Ø	Ø	/	/
84.	Ø	Ø	Ø	/	/
91.	Ø	Ø	+	/	/
98.	Ø	Ø	+	/	/
131.	Ø	Ø	Ø	/	/
146.	Ø	Ø	Ø	/	/
159.	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
173.	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
219.	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
240.	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
260.	Ø	Ø	v.	Ø	Ø
289.	Ø	Ø	v.	Ø	Ø
319.	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
333.	Ø	Ø	Ø	+	Ø

Tab. 6 (Fortsetzung): Reisolation von *T. equigenitalis* bei einem experimentell infizierten Ponyhengst (Tier 2)

d.p.inf.	PS	HR	EG	VS	Eja
351.	Ø	Ø	Ø	+	Ø
355.	Ø	+	Ø	Ø	Ø
367.	Ø	Ø	v.	v.	v.
386.	Ø	Ø	v.	Ø	Ø
398.	Ø	Ø	Ø	v.	+

Legende: Ø Erregernachweis negativ

+ Erregernachweis positiv

v Mikroskopischer Nachweis verdächtiger Kulturen

/ keine Probenentnahme

Die bakteriologische Untersuchung der von der Ponystute vor der Bedeckung durch Ponyhengst 2 viermal im Abstand von 14 bis 30 Tagen entnommenen Uterus-, Zervix- und Klitoristupfer auf *T. equigenitalis* verlief negativ. Am 3. Tag und 5. Tag nach dem Deckakt durch genannten Ponyhengst konnte aus Zervix- und Uterustupfern *T. equigenitalis* kulturell nachgewiesen werden. Dabei waren am 3. Bebrütungstag vereinzelt große Kolonien, am 7. Bebrütungstag zusätzlich zahlreiche kleine Kolonien zu beobachten. Am 14. Tag nach dem ersten Deckakt wurden letztmalig Taylorellen aus der Klitoristupferprobe isoliert. Die weiteren vier bakteriologischen Untersuchungen von Klitoris-, Zervix- und Uterustupfern im Abstand von je 10 Tagen verliefen negativ.

#### 4.2.2. Klinischer Verlauf der Taylorelleninfektion

Beide infizierten Ponyhengste zeigten im Verlauf des Infektionsversuches keine klinischen Symptome, die auf die Wirkung von *T. equigenitalis* zurückgeführt werden könnte. Bei Ponyhengst 2 waren am 237. und 238. d.p.inf. Symptome einer leichten Kolik zu beobachten.

#### 4.2.3. Ergebnisse des serologischen Untersuchungen

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen der beiden Ponyhengste sind in den Tabellen 7 und 8 zusammengefaßt.

Tab. 7: Ergebnisse der serologischen Untersuchung bei Ponyhengst 1

d.p. inf	SLA	HT	PHA	KBR	IFT
- 40.	1:5	1:5	Ø	Ø	Ø
0.	Ø	Ø	Ø	Ø	1:10
7.	Ø	1:5	Ø	Ø	1:10
14.	Ø	1:5	Ø	Ø	Ø
22.	Ø	1:5	Ø	Ø	Ø
28.	Ø	1:5	Ø	Ø	Ø
75.	Ø	1:5	Ø	Ø	Ø
83.	Ø	1:5	Ø	Ø	Ø
91.	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
110.	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
138.	Ø	1:5	Ø	Ø	Ø
168.	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø



Tab. 8: Ergebnisse der serologischen Untersuchung bei Ponyhengst 2

d.p. inf	SLA	HT	PHA	KBR	IFT
1.	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
3.	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
7.	1:10	Ø	Ø	Ø	Ø
10.	1:10	Ø	Ø	Ø	Ø
14.	1:10	Ø	Ø	Ø	Ø
17.	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
21.	1:10	Ø	Ø	Ø	Ø
24.	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
28.	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
35.	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
42.	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
49.	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
56.	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
84.	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
91.	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
98.	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
131.	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
146.	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
156.	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
219.	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
240.	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
260.	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
388.	1:10	Ø	Ø	Ø	1:10
403.	1:5	Ø	Ø	Ø	Ø
423.	1:10	Ø	Ø	Ø	1:10

#### 4.2.4. Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen

Die Darstellung der Ergebnisse der Untersuchung des roten und weißen Blutbildes bei Ponyhengst 1 und Ponyhengst 2 erfolgt in den Tabellen 9, 10, 11, und 12.

Tab. 9: Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen von einem mit *T. equigenitalis* infizierten Ponyhengst (Tier 1)

d.p.inf.	Hb,alt	Hb,neu	HK	Ery	MCV	MCH	MCHC
- 34.	11,1	6,89	30	7,29	41,2	15,2	37,0
0.	11,5	7,14	34	8,83	38,5	13,0	33,8
7.	13,3	8,25	36	9,41	38,3	14,1	36,9
14.	13,6	8,44	36	7,53	20,5	18,1	37,8
28.	15,1	9,37	39	11,14	35,0	13,5	38,7
83.	11,8	7,32	32	9,55	33,5	12,4	36,9
91.	10,2	6,38	28	8,25	33,9	12,4	36,4
169.	12,8	7,84	35	7,84	45,8	16,8	36,6
173.	14,1	8,75	39	8,09	48,2	17,4	36,2

Tab. 10: Differentialblutbild eines experimentell mit *T. equigenitalis* infizierten Ponyhengstes (Tier 1)

d.p.inf.	Bas	Eos	Myel	Granulozyten Jgdl ugk gk sgm	klLy	grLy	Mon	Leu
- 34.	0	5	0	0 0 9 34	34	19	0	6450
0.	0	6	0	0 13 12 31	31	6	2	5800
7.	0	5	0	1 17 10 31	31	3	2	4000
14.	0	3	0	0 1 16 22	52	4	0	7300
28.	0	3	0	0 0 11 32	47	7	0	6400
83.	0	4	0	0 0 12 22	57	3	1	6300
91.	0	1	0	0 0 28 11	53	6	1	6050
169.	0	3	0	0 0 2 30	43	20	2	6650
173.	0	2	0	0 2 3 22	37	34	0	7600

Tab. 11: Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen von einem mit *T. equigenitalis* infizierten Ponyhengst (Tier 2)

d.p.inf.	Hb,alt	Hb,neu	HK	Ery	MCV	MCH	MCHC
- 1.	10,3	6,39	32	10,19	43,4	10,1	32,2
3.	10,9	6,74	37	7,59	48,7	14,4	29,5
7.	9,4	5,83	36	8,08	44,6	11,6	26,1
10.	15,8	9,80	41	10,49	39,1	15,1	38,5
14.	13,8	8,56	35	8,01	43,7	17,2	39,4
17.	13,7	8,50	36	8,55	43,1	16,0	38,1
21.	15,3	9,49	39	9,49	42,1	16,5	39,2
24.	14,0	8,69	38	9,04	42,0	15,5	36,8
28.	13,9	8,63	33	7,91	41,7	17,6	42,1
35.	13,7	8,50	37	8,72	42,4	15,7	37,0
42.	13,3	8,25	34	8,81	38,6	15,1	39,1
49.	11,6	7,20	35	8,12	43,1	14,3	33,1
56.	14,0	8,69	38	9,50	40,0	14,7	36,8
84.	11,9	7,38	33	7,84	42,1	15,2	36,1
91.	10,7	6,64	38	7,23	52,6	14,8	28,2
98.	10,5	6,52	37	8,99	41,2	11,3	28,4
131.	12,8	7,94	34	9,21	36,9	13,9	37,6
146.	13,2	8,19	35	9,01	38,8	14,7	37,7
156.	12,9	8,01	36	8,64	41,7	14,9	35,8
219.	12,6	7,82	34	7,64	44,5	16,5	37,1
240.	11,2	6,95	31	7,10	43,7	15,8	36,1
260.	14,4	8,94	38	8,78	43,3	16,4	37,9
388.	15,8	9,80	38	8,50	44,7	18,6	41,6
403.	12,3	7,63	34	8,11	41,9	15,2	36,2
423.	13,8	8,56	38	9,36	40,6	14,7	36,3

Tab. 12: Differentialblutbild eines experimentell mit *T. equigenitalis* infizierten Ponyhengstes (Tier 2)

d.p.inf.	Bas	Eos	Myel	Granulozyten JgdI ugk gk sgm	klLy	grLy	Mon	Leu
-1.	0	0	0	0 1 10 34	34	17	4	7950
3.	0	2	0	0 0 2 20	27	47	2	8700
7.	0	1	0	0 0 3 20	25	48	3	12000
10.	0	2	0	0 1 3 27	43	22	2	10100
14.	0	1	0	0 0 2 31	26	38	2	11500
17.	0	1	0	0 0 5 23	31	36	4	10850
21.	0	4	0	0 0 3 31	21	38	3	11150
24.	0	0	0	0 0 6 21	25	48	0	9550
42.	0	3	0	0 0 10 27	38	20	2	10200
49.	0	1	0	0 0 11 29	13	45	1	8850
56.	0	0	0	0 0 2 26	38	34	0	12600
84.	0	3	0	0 2 10 23	11	50	1	9750
91.	1	6	0	0 0 2 33	13	43	2	9550
98.	0	2	0	0 0 7 31	35	22	3	10450
131.	0	6	0	0 0 5 27	30	31	1	9200
146.	2	4	0	0 0 6 22	25	41	0	8350
156.	0	3	0	0 1 8 27	35	25	1	8350
219.	0	1	0	0 0 7 32	23	36	1	8650
240.	0	0	0	0 5 6 3	30	56	0	4450
260.	0	1	0	0 0 6 24	22	47	0	10300
388.	0	1	0	0 1 7 39	29	23	0	9750
403.	0	6	0	0 1 6 20	23	40	4	7050
423.	0	6	0	0 0 8 27	28	30	1	10400

#### 4.2.5. Postmortaler kultureller Nachweis von *T. equigenitalis*

In der postmortalen Untersuchung der Harn- und Geschlechtsorgane beider Ponyhengste konnte *T. equigenitalis* nur in den äußeren Geschlechtsorganen sicher nachgewiesen werden. Bei der Untersuchungen der akzessorischen Geschlechtsdrüsen und der Gonaden sowie der Harnblasen wurden wiederum mikroskopisch

verdächtige, d.h. im Grampräparat für *T. equigenitalis* sprechende Bakterien beobachtet. Diese konnte jedoch auf Grund ausbleibenden Wachstums beim Versuch der Subkultivierung nicht weiter identifiziert werden, so daß nur ein Verdacht ausgesprochen werden konnte. Die Besiedlung der in der bakteriologischen Untersuchung positiven Organe durch *T. equigenitalis* war mit Ausnahme der primären und sekundären Eichelgruben sehr gering.

Die der Untersuchung der Organe des Harnapparates (außer Harnblase) und der Lymphknoten verliefen negativ.

Die in der Untersuchung der Organe des Ponyhengstes 1 verwendeten Pferdekochblutplatten mit Zusatz unterschiedlicher Mengen Oxazillin und Lincomyzin zeigten keinen Vorteil gegenüber den Nährmedien ohne Antibiotikazusatz. Im Falle eines positiven Eregernachweises wurde ein Wachstum von kleinen Kolonien von *T. equigenitalis* erst ab dem 9. Bebrütungstag beobachtet. In den folgenden Subkulturen trat ein Keimwachstum zwischen dem 2. und 5. Bebrütungstag auf.

Bei der Untersuchung der postmortal entnommenen Organe des Ponyhengstes 2 waren bei positiven Ergebnissen Bebrütungszeiten von 7 Tagen (Eichelgruben) bis 9 Tagen (Urethra, Eichel, Penisschaft) bis zum visuellen Wahrnehmbarkeit der aufgetretenen kleinen Kolonievariante notwendig. Diese zeigte in der Subkultivierung ebenfalls ein Wachstum zwischen dem 2. und 5. Bebrütungstag.

Die Ergebnisse der postmortalen bakteriologischen Untersuchungen sind in Tabelle 13 zusammengefaßt.

Tab. 13: Postmortaler bakteriologischer Nachweis von *T. equigenitalis* bei zwei experimentell infizierten Ponyhengsten

Untersuchungsmaterial	Hengst 1	Hengst 2
Lnn. inguinales supff.	Ø	Ø
Lnn. renales	Ø	Ø
Lnn. sacrales intt.	Ø	Ø
Lnn. sacrales extt.	Ø	Ø
Lnn. coeliaci	Ø	Ø
Lnn. ilici medd.	Ø	Ø
Lnn. hypogastrici	Ø	Ø
Lnn. lumbales aortici	Ø	Ø

Tab. 13 (Fortsetzung): Postmortaler bakteriologischer Nachweis von *T. equigenitalis* bei zwei experimentell infizierten Ponyhengsten

Untersuchungsmaterial	Hengst 1	Hengst 2
Niere	Ø	Ø
Nierenbecken	Ø	Ø
Harnleiter	Ø	Ø
Harnblase	v.	v.
Hoden	v.	v.
Nebenhodenkopf	v.	v.
Nebenhodenkörper	Ø	Ø
Nebenhodenschwanz	v.	v.
Samenleiter	Ø	Ø
Samenleiterampullen	v.	Ø
Prostata	Ø	v.
Samenblasen	Ø	v.
Bulbourethraldrüsen	Ø	Ø
Urethra (proximaler Abschnitt)	+	Ø
Urethra (mittlerer Abschnitt)	+	+
Urethra (distaler Abschnitt)	+	+
Eichel	S	+
primäre Eichelgrube	+	+
sekundäre Eichelgrube	+	+
Präputium	S	S
Penisschaft	+	S

Legende: Ø Erregernachweis negativ  
 + Erregernachweis positiv  
 v. Mikroskopischer Nachweis verdächtiger Kulturen  
 S Platten von Sporenbildnern überwuchert

#### 4.2.6. Ergebnisse der pathologischen Untersuchungen

Bei der nach der Euthanasie beider Ponyhengste durchgeführten pathologisch-anatomischen Untersuchungen der äußeren und inneren Geschlechtsorgane sowie der Organe des Harnapparates beider Ponyhengste und in der pathologisch-histologischen Untersuchen o.g. Organe des Ponyhengstes 1 konnten keine Verän-

derungen festgestellt werden.

Die histopathologische Untersuchung der Harn- und Geschlechtsorgane des Ponyhengstes 2 wurden die folgenden pathologischen Veränderungen festgestellt. In der Samenblase traten vereinzelte herdförmige lympho-histiozytäre Infiltrationen auf (Abb. 1).

In den Hoden traten vereinzelt Riesenzellen auf, die Spermiogenese war deutlich vermindert (Abb. 2). Die Nebenhodenkanälchen erwiesen sich in diesem Zusammenhang als teilweise spermienfrei (Abb. 3).

Im Bereich der distalen Urethra waren Lymphfollikel zu beobachten. Die Untersuchung der sekundären Eichelgruben ergab subepitheliale lympho-histiozytäre Infiltrate.

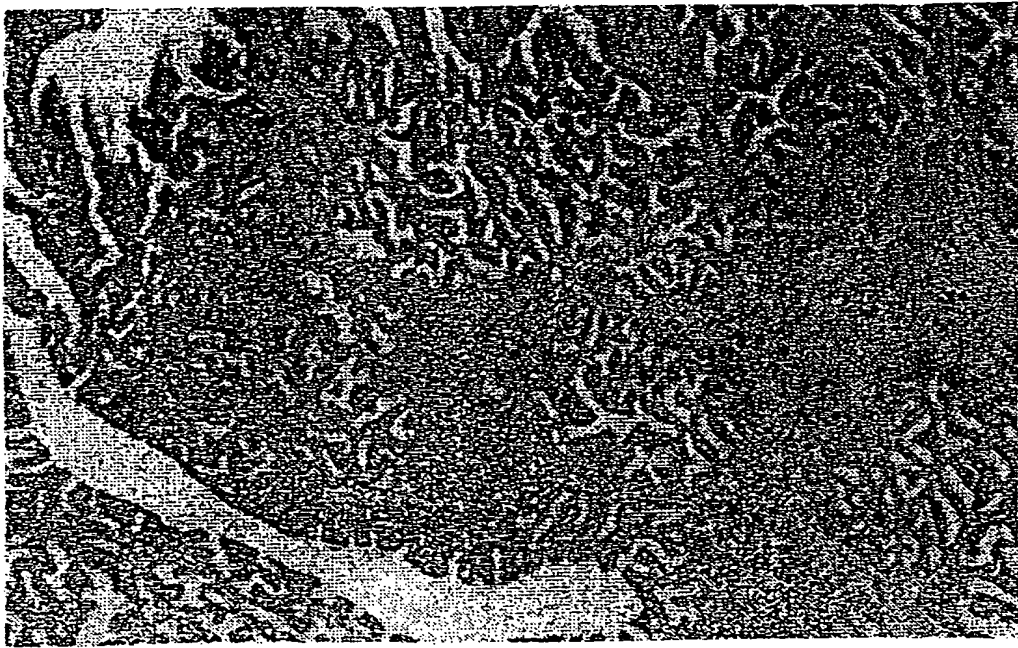


Abb. 1 : Lympho-histiozytäre Infiltrate in der Samenblase (19fache Vergrößerung)

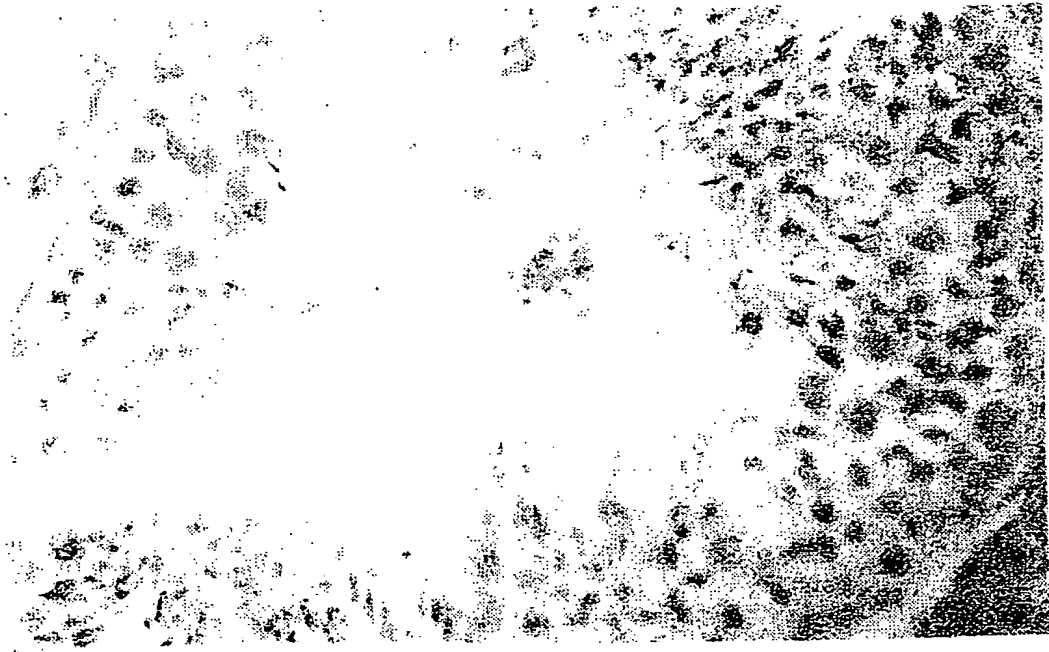


Abb. 2: Riesenzelle im Lumen der Hodenkanälchen (125fache Vergrößerung)

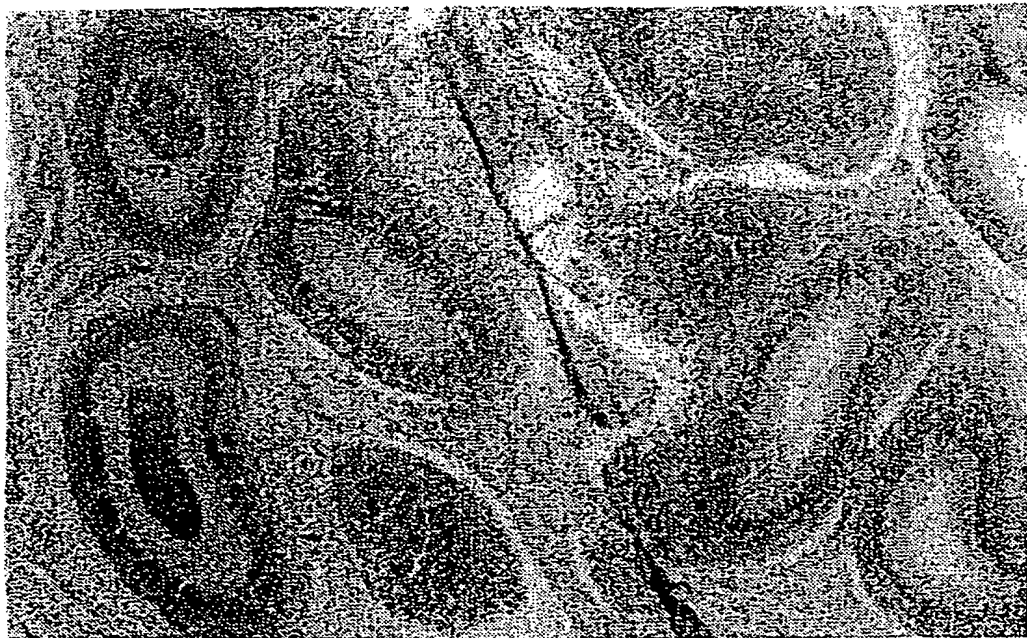


Abb. 3: Nebenhoden, Kanälchen teilweise spermienfrei (19fache Vergrößerung)



#### 4.2.7. Immunhistologischer Nachweis von *T. equigenitalis*

In der Untersuchung der Organ- und Gewebsschnitte des Ponyhengstes 2 im IFT mit der Doppelmarkierungstechnik traten Fluoreszenzen mit gleicher Lokalisation im Gewebe bei Anregung mit UV-Licht und grünem Licht vereinzelt in den Samenkanälchen der Hoden (Abb. 4, Abb. 5) sowie im Lumen der Samenblase auf.

Spezifische Fluoreszenzen waren ebenfalls in den Schleimhautfalten der Eichel und der Urethra zu beobachten. Bei der Untersuchung der primären und sekundären Eichelgruben waren insbesondere in letzteren verstärkt fluoreszierende Bakterien zu beobachten. Bei der Anregung des FITC-Konjugates zeigten neben Stäbchen auch Kokken eine deutliche Membranfluoreszenz, während in der Anregung des Rhodaminkonjugates nur Stäbchen fluoreszierten.

Negativ verliefen die immunhistologischen Untersuchungen der regionalen Lymphknoten, der Niere, Harnleiter, Harnblase, Nebenhoden, Samenleiter, der Samenleiterampulle, der Prostata, der Bulbourethraldrüsen und des Präputiums.

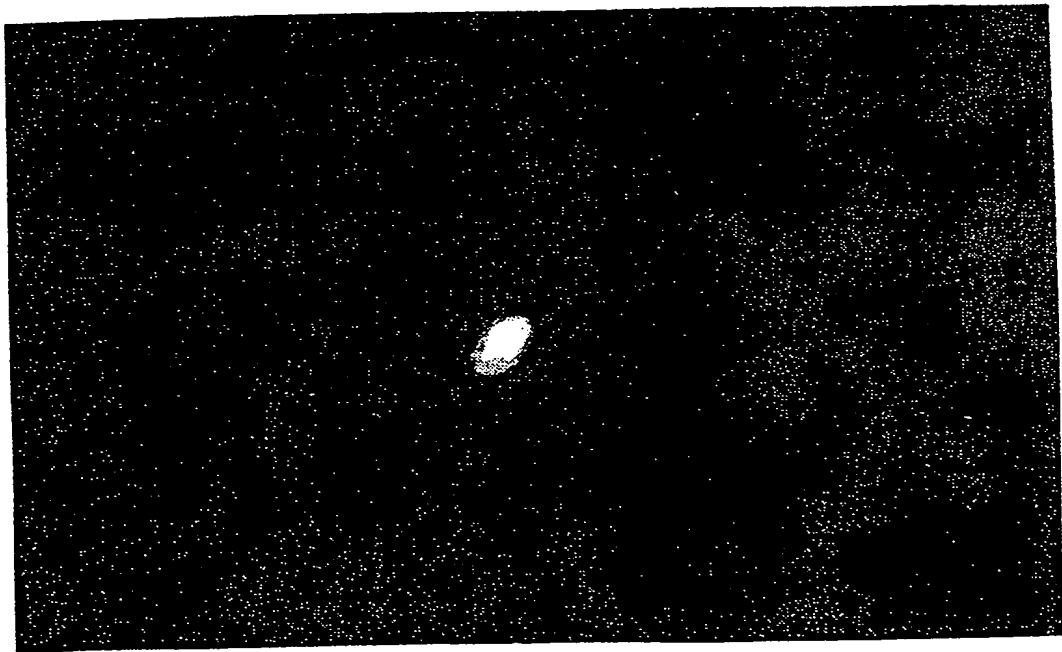


Abb. 4: Fluoreszenz im Hodenkanälchen bei der FITC-Anregung (Ölimmersion, 1000fache Vergrößerung)

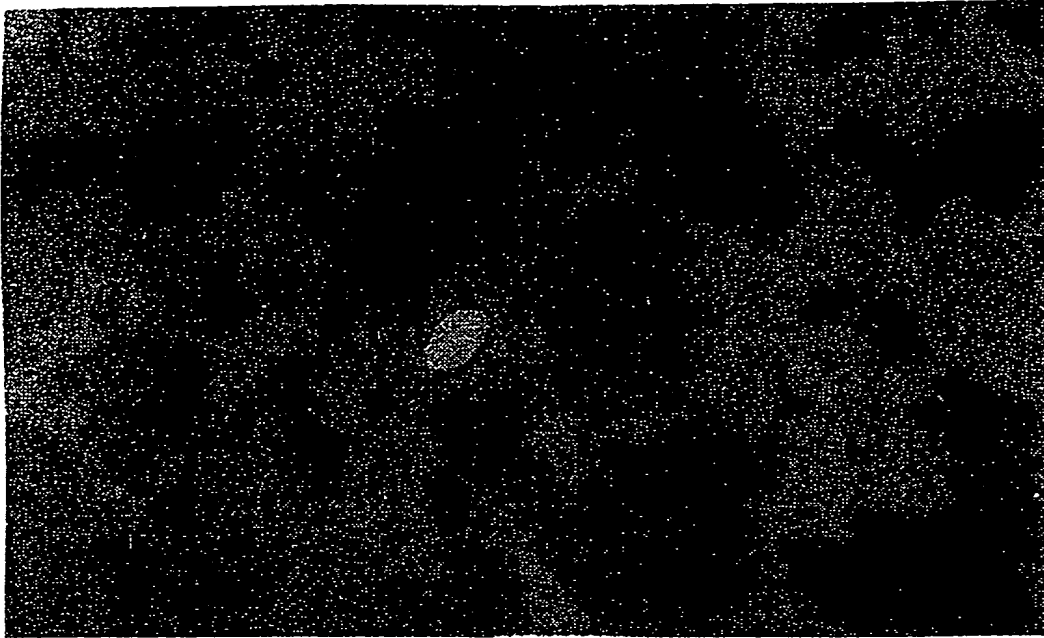
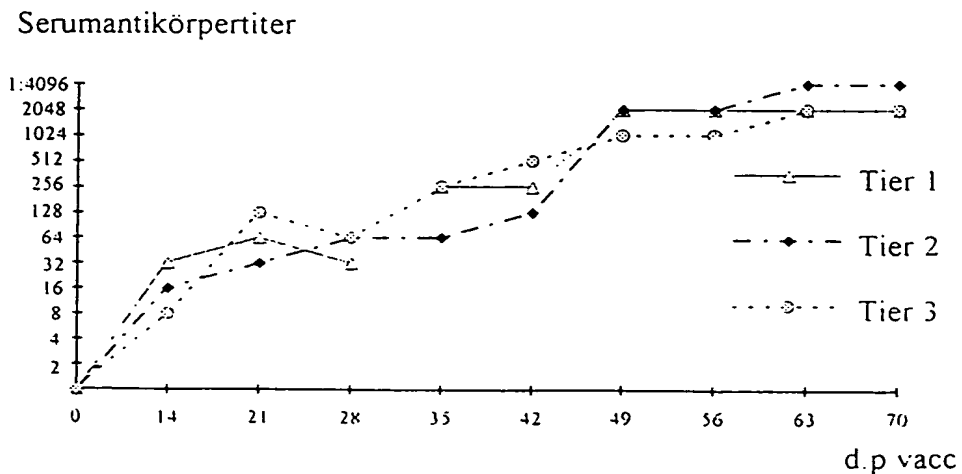


Abb. 5: Fluoreszenz im Hodenkanälchen bei der Rhodamin-Anregung (gleicher Bildausschnitt wie Abb. 4, Ölimmersion, 1000fache Vergrößerung)

#### 4.2.8. Immunserumherstellung im Kaninchen

Alle drei vakzinierten Kaninchen zeigten einen schnellen Anstieg der Antikörpertiter, die nach der Boosterung ein Plateau erreichten (Abb. 6).

Abb. 6: Verlauf der in der PHA gemessenen Antikörpertiter gegen *T. equigenitalis* im Serum von 3 immunisierten Kaninchen



Das gepoolte Kaninchenserum hatte in den angewandten serologischen Nachweismethoden folgende Antikörpertiter gegen *T. equigenitalis*: OSA 1:128, PHA 1:1280, SLA 1:320, HT 1:160, KBR 1:512, IFT 1:512. In der OSA trat lediglich bei der Verwendung von unverdünntem Serum mit *Actinobacillus equuli* eine Agglutination auf, die jedoch in der nächsthöheren Verdünnungsstufe von 1:2 ausblieb. Gegen alle anderen getesteten Bakterienstämme konnten keine Kreuzreaktionen beobachtet werden.

#### 4.2.9. Charakterisierung monoklonaler Antikörper

Die mit 3 verschiedenen Antigenpräparationen immunisierten Balb/c-Mäuse zeigten 2 Wochen nach der Grundimmunisierung im ELISA Antikörper gegen *T. equigenitalis*. Die Titer stiegen nach den Boosterinjektionen weiter an, erreichten ihren Höhepunkt zwischen dem 90. und 130. d.p.vacc. und begannen danach wieder zu sinken. Die Tabelle stellt die Titerdynamik dar.

Tab. 14: Titerverläufe bei immunisierten Balb/c-Mäusen

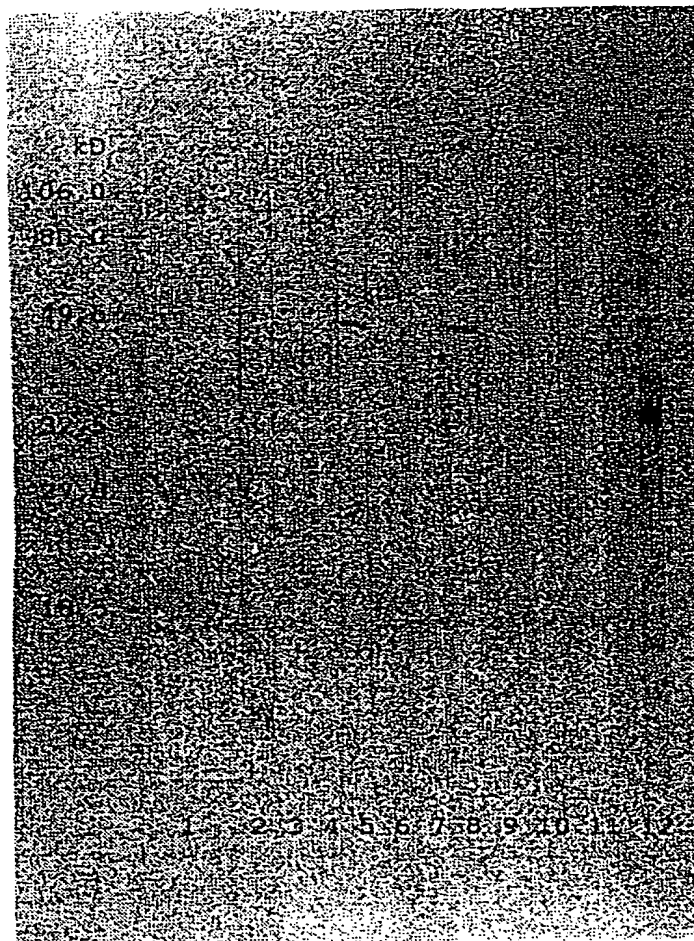
d.p.vacc.	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 4	Maus 5	Maus 6
0.	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	negativ
14.	1:2560	1:2560	1:640	1:640	1:320	1:640
21.	1:10240	1:10240	1:5120	1:2560	1:2560	1:2560
35.	1:5120	1:5120	1:5120	1:5120	1:5120	1:5120
70.	1:10240	1:5120	1:10240	1:10240	1:10240	1:10240
90.	1:10240	1:5120	1:10240	1:10240	1:20480	1:20480
110.	1:10240	1:5120	1:10240	1:5120	1:10240	1:10240
130.	1:5120	1:5120	1:10240	1:5120	1:5120	1:5120
142.	1:5120	1:5120	1:5120	1:5120	1:5120	1:5120
207.					1:5120	1:2560
Endtiter	1:5120	1:5120	1:5120	1:5120	1:2560	1:2560

In den Fusionen, in denen als Fusionspartner die murine Myelomzelllinie P3X63-Ag8 eingesetzt wurden, konnten keine stabilen antikörperproduzierenden Hybridomzelllinien etabliert werden. Demgegenüber wurden in den 3 Fusionen mit der Heteromyelomzelllinie CB-F7 als Fusionspartner 89 antikörperproduzierende Hybridomzelllinien etabliert. Aus dieser Gesamtmenge wurden nach der Untersuchung von 45 verschiedenen Klonen im Westernblot die Klone TF I 10D5, TF II

8D4, TF III 10G5, TF III 11B5, TF III 11E5, TF III 7D4, TF III 3G3, TF III 3E8 auf Grund ihrer unterschiedlichen Reaktion im Immunoblot zu weiteren Charakterisierung ausgewählt.

In der Abbildung 7 ist die Immunoblot-Reaktivität der gegen *T. equigenitalis* gerichteten mAK dokumentiert. Der mAK TF II8D4 zeigte als einziger der ausgewählten mAK keine eindeutige Reaktion mit einem bestimmten Protein. Der gesamte NC-Streifen (Nr.9) wurde diffus angefärbt. Die mitgeführte Negativkontrolle (Nr.10) sowie die Konjugatkontrolle (Nr.11) zeigten eine schwache unspezifische Reaktion mit einem 19-KD großen Protein. Diese Reaktion war auf allen NC-Streifen vorhanden.

Abb. 7: Immunoblot-Reaktivität mAk gegen *T. equigenitalis*



- Legende: Nr. 1 Molekulargewichtsmarker      7 TF III 11B5  
2 TF I 10D2      8 TF III 3G3  
3 TF III 7D4      9 TF II 8D4  
4 TF III 10G5      10 Kufu 2  
5 TF III 3E8      11 Konjugatkontrolle  
6 TF III 11E5      12 Mausserum

Die Immunglobulinsubklassen, der ELISA- und IFT-Titer der Hybridomaüberstände sowie die relativen Molekulargewichte der im Immunoblot erkannten Proteine von *T. equigenitalis* sind in Tabelle 15 zusammengefaßt.

Tab. 15: Eigenschaften mAK gegen *T. equigenitalis*

mAK	Immunglobulin-subklasse	Titer ELISA / IFT	Molekulargewicht der erkannten Proteine
TF I 10D2	Ig G <sub>2a</sub>	1:128/1:10	13 kD
TF II 8D4	Ig M	1:8192/1:320	keine Reaktion
TF III 11E5	Ig G <sub>2a</sub>	1:8192/1:320	56 kD
TF III 11B5	Ig G <sub>2a</sub>	1:8192/1:320	70 kD, 117 kD
TF III 10G5	Ig G <sub>1</sub>	1:8192/1:10	35 kD
TF III 7D4	Ig G <sub>2a</sub>	1:5121/1:5	22 kD
TF III 3G3	Ig G <sub>2a</sub>	1:128/1:10	47 kD, 70 kD
TF III 3E8	Ig G <sub>1</sub>	1:128/1:10	47 kD

Die Untersuchung der selektierten mAk im ELISA hinsichtlich ihrer Fähigkeit, unterschiedliche *T. equigenitalis*-Isolate zu erkennen, zeigte Unterschiede in der Antigenstruktur dieser Spezies. Der *T. equigenitalis*-Stamm I/3 wird vom mAK TF III 11E5 (Abb. 12), der Stamm BW 26 vom mAK TF I 10D5 im ELISA nicht erkannt (Abb. 9). Ferner sind neben diesen qualitativen Unterschieden auch quantitative Unterschiede zu beobachten. Diese deutlichen Unterschiede in den gemessenen Extinktionen traten mit Ausnahme des mAK TF II 8D4 bei allen anderen geprüften mAK in unterschiedlichem Ausmaße auf. Die Ergebnisse der Spezifitätsprüfung sind in den Abbildungen 9 bis 19 im Tabellenanhang dargestellt.

In der Prüfung möglicher Kreuzreaktionen aller verwendeten mAk mit Vertretern verschiedener Bakteriengattungen konnten keine Antigenverwandtschaften nachgewiesen werden. Eine Aussage über mögliche Antigenverwandtschaft von *T. equigenitalis* mit *Streptococcus zooepidemicus* und *Streptococcus equi* kann auf Grund der in der Abbildung dargestellten unspezifischen Bindung des verwendeten Konjugates nicht getroffen werden (Abb. 19).

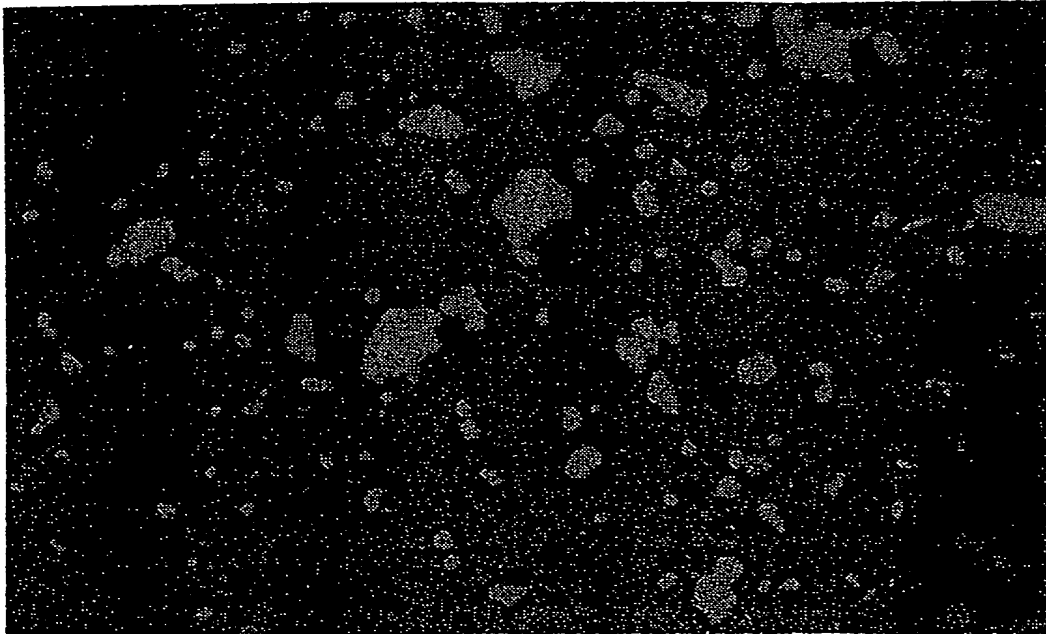
Die Ergebnisse der Überprüfung der mAK hinsichtlich ihrer Fähigkeit, verschiedene Taylorellenisolat und Vertreter verschiedener Bakteriengattungen im ELISA zu erkennen, ist in den Abbildungen 9 bis 16 veranschaulicht.

Während der als Negativkontrolle eingesetzte mAK Kufu 2 weder mit den geprüften Taylorellenstämmen noch mit den anderen Bakterienspezies reagierte, zeigte das als Positivkontrolle eingesetzte Mausimmenserum mit der Mehrzahl der

eingesetzten Bakterienspezies schwachpositive Reaktionen (Extinktion > 300). Die stärksten Reaktionen traten mit *Haemophilus somnus*, *Micrococcus albus* und *Bordetella bronchiseptica* auf (Abb. 17).

Im IFT zeigten von allen 8 untersuchten mAK lediglich die mAk der Klone TF II 8D4, TF 11B5 und TF III 11E5 eine sehr gute Fluoreszenz bis zu einer Verdünnungsstufe von 1:320 (Abb. 8). Die übrigen mAK reagierten lediglich in den Verdünnungsstufen von 1:5 bis 1:10. Die mAK erkannten die im Kulturmaterial vorkommende Stäbchenform und kokkoide Form von *T. equigenitalis* gleichermaßen.

Abb. 8: Reaktion des mAK TF III 11E5 im IFT



## 5. Diskussion der Ergebnisse

### Ergebnisse der bakteriologischen und klinischen Untersuchungen

Nach dem Deckakt des Ponyhengstes 1 mit der T.-equigenitalis-positiven Ponystute wurde der Erreger in Tupferproben vom Penischaft, der Harnröhre, der Eichelgrube sowie aus dem Vorsekret und Ejakulat isoliert. Ebenfalls gelang es, nach dem Deckakt des Ponyhengstes 2 mit der Ponystute T. equigenitalis auf die Ponystute zu übertragen. Damit konnte die wechselseitige Übertragbarkeit des Erregers durch den Deckakt demonstriert werden.

TAINTURIER et al. (1982a) gelang es ebenfalls, durch den Deckakt T. equigenitalis von einer infizierten Stute auf insgesamt 8 Hengste zu übertragen.

Daß der Deckakt mit einer infizierten Stute nicht zwangsläufig zur Erregerübertragung führt, konnten SCHLÜTER et al. (1991) in Übertragungsversuchen mit Traberhengsten und -stuten nachweisen. Den Autoren gelang es nicht, den Erreger bei 2 Hengsten, die eine T.-equigenitalis-positive Stute mehrfach gedeckt hatten, nachzuweisen.

Inwiefern das Haften der Infektion nach der Übertragung des Erregers rasse- oder altersabhängig ist oder ob andere individuelle prädisponierende Faktoren eine Rolle spielen, bedarf weiterer Untersuchungen.

Die häufigsten Nachweise des CEM-Erregers gelangen beim Ponyhengst 1 aus dem Vorsekret mit 11 positiven Ergebnissen, während die Tupferproben aus der Harnröhre lediglich 6 positive Resultate lieferten. Die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen von Penischaft und Eichelgrube kommen mit jeweils 10 positiven Erregernachweisen denen des Vorsekretes gleich. Aus dem Ejakulat gelang es, bei insgesamt drei entnommenen Proben den Erreger zweimal nachzuweisen.

Ein völlig anderes Bild hinsichtlich des Verlaufes der bakteriologischen Untersuchungen wurde im Versuchsabschnitt II in der bakteriologischen Kontrolle des Ponyhengstes 2 beobachtet. Der Erreger konnte aus der Harnröhre trotz der intraurethral durchgeführten Belastung mit T. equigenitalis aus der Harnröhre lediglich am 355. d.p.inf. reisoliert werden. Die Untersuchungen des Ejakulats verliefen einmal positiv, die des Vorsekretes ergaben 4 positive Befunde. Mit insgesamt 8 Taylorellennachweisen gelangen aus den Eichelgrubentupfern bei diesem Tier die häufigsten Erregernachweise, wogegen in den Tupferproben vom Penischaft das CEM-Bakterium über die gesamte Versuchsdauer von 433 Tagen

nicht nachgewiesen werden konnte.

Die negativ verlaufenen Erregernachweise aus den Penisschaftstupfern könnten mit dem vom Versuchsabschnitt I abweichenden Infektionsmodus zusammenhängen, da beim natürlichen Deckakt der gesamte Penisschaft des Ponyhengstes 1 mit der taylorellenbehaften Vaginalschleimhaut in Kontakt kam, während der Ponyhengst 2 intraurethral infiziert wurde.

TAINTURIER et al. (1982a) konnten bei insgesamt 3 intraurethral infizierten Ponyhengsten den Erreger ebenfalls nicht vom Penisschaft isolieren.

Die Gegenüberstellung der positiven Untersuchungsergebnisse von beiden Ponyhengsten zeigt, daß es hinsichtlich einer hohen Nachweissicherheit des direkten Erregernachweises keinen Ort am äußeren Hengstgenitale gibt, von dem der Erreger beliebig reproduzierbar angezüchtet werden kann, obwohl *T. equigenitalis* in der Summe beider Versuchsabschnitte am häufigsten aus Tupferproben der Eichelgrube reisoliert wurde. Erst die Untersuchung der Gesamtheit aller für den Erregernachweis in Frage kommenden Proben (Tupferproben vom Penisschaft, der Eichelgrube, der Harnröhre sowie das Vorsekret und Ejakulat) bietet die beste Voraussetzung für einen erfolgreichen Nachweis von *T. equigenitalis*.

PLATT et al. (1978) beschrieben einen dem Versuchsabschnitt II ähnlichen Verlauf der bakteriologischen Reisolation bei 4 artifiziell infizierten Ponyhengsten. Die Autoren konnten die höchsten Nachweisquoten von *T. equigenitalis* aus Tupferproben der Eichelgruben erzielen, wohingegen die bakteriologischen Untersuchungen der Penisschaftproben am häufigsten negativ verliefen.

LORIN et al. (1984) gelang es, in bakteriologischen Untersuchungen aus Probenmaterial von 11 natürlich infizierten Hengsten 11mal den Erreger in den Tupferproben der Eichelgrube nachzuweisen, während sich nur 4 Proben aus der Harnröhre und je eine Probe des Penisschaftes bzw. des Ejakulates als positiv erwiesen.

Die in eigenen Reisolationsversuchen erzielten wie auch die in der Literatur dargestellten Ergebnisse hinsichtlich der hohen Nachweisraten von *T. equigenitalis* aus Eichelgrubentupfern unterstützen die durch SIMPSON und EATON-EVANS (1978) und HAZARD et al. (1979) formulierte Hypothese, daß die Eichelgruben des Hengstes als anatomisches Analogon zum Klitorissinus der Stute der Hauptkolonisationsort beim Hengst ist.

Die stets smegmagefüllten sekundären Eichelgruben bieten mit ihrem sauerstoffarmen und feuchten Milieu *T. equigenitalis* ideale Nischen zur Kolonisation.



Die bis zum 173. d.p.inf. beim Ponyhengst 1 bzw. bis zum 389. d. p. inf. beim Ponyhengst 2 dauernde Persistenz von *T. equigenitalis* unterstreicht die bereits durch TIMONEY und POWELL (1982) bzw. TIMONEY und STRICKLAND (1982) aufgezeigte Möglichkeit der mehrmonatigen Erregerpersistenz.

Daß nach der Infektion des Hengstes mit dem CEM-Erreger auch eine schnelle Keimelimination eintreten kann, zeigt ein Infektionsversuch durch TAINTURIER et al. (1982a), denen es lediglich am 9. d.p.inf. bei einem intraurethral infizierten Ponyhengst gelang, positive Erregernachweise zu erzielen. Weitere Erregernachweise verliefen negativ.

Die bei Ponyhengst 1 erzielten positiven Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung des Vorsekretes am 15. d.p.inf. und des Vorsekretes und Ejakulates am 173.d.p.inf. sowie die ebenfalls positiven Erregernachweise am 333. und 351. d.p.inf. aus dem Vorsekret und am 398. d.p.inf. aus dem Ejakulat des Ponyhengstes 2 bei gleichzeitig negativen bzw. verdächtigen Ergebnissen der untersuchten Tupferproben von Penisschaft, Eichelgrube und Harnröhre unterstützen die von SCHLÜTER et al. (1990) geäußerte Vermutung über eine mögliche Besiedlung der inneren Geschlechtsorgane des Hengstes durch *T. equigenitalis*. Die Autoren formulierten diesen Verdacht auf Grund von Erregernachweisen im Vorsekret und Sperma bei gleichzeitig negativen Ergebnissen von Tupferproben der äußeren Genitalien eines natürlich infizierten Hengstes nach insgesamt 8 Behandlungszyklen.

Die bei der bakteriologischen Untersuchung der von beiden Ponyhengsten entnommenen Proben beobachtete Reduktion der gewachsenen *T.-equigenitalis*-Kolonien sowie die Transformation des Kolonietypes vom großen, schnellwachsenden zum kleinen, langsam wachsenden Kolonietyp muß mit der durch SWERCZEK (1979c), DOLAN et al. (1984) und VAISSAIRE (1986) beschriebenen Hemmwirkung der physiologischen Bakterienflora und dem symptomlosen Verlauf der CEM-Infektion beim Hengst im Zusammenhang gesehen werden.

Da in der Literatur keine Angaben über die Transformation des Koloniewachstums von *T. equigenitalis* in Kulturen vom Hengst existieren, kann lediglich auf Veröffentlichungen über Infektionsversuche bei Stuten verwiesen werden.

KANEMARU et al. (1988) infizierten Vollblut- und Ponystuten mit Kulturmaterial bestehend aus der großen Kolonievariante bzw. aus der kleinen Kolonievariante. Dabei zeigte die mit dem großen Kolonietyp infizierten Stuten CEM-typische Symptome (Endometritis, Zervicitis, Vaginitis), während die mit dem kleinen Kolonietyp infizierten Stuten keinerlei Reaktion zeigten.

SAHU und WEBER (1982) inokulierten drei Ponystuten Kulturmaterial vom kleinen Kolonietyp und beschrieben eine von der Schnelligkeit der Transformation vom kleinen zum großen Kolonietyp bestehende Abhängigkeit der Schwere der klinischen Symptome. Während bei der 1. Ponystute bereits am 3. d.p.inf. fast ausschließlich große Kolonien beobachtet wurden, dauerte die Transformation bei den anderen beiden Ponystuten bis zum 14. d.p.inf. Dementsprechend waren nur bei der ersten Ponystute stark ausgeprägte CEM-Symptome zu beobachten. Ausgehend von dem Wachstum des kleinen Kolonietypes bei der bakteriologischen Untersuchung des Ponyhengstes 2 am 351. d.p.inf. ist anzunehmen, daß durch den Deckakt des Ponyhengstes mit der Ponystute ausschließlich langsam wachsende Taylorellen auf den Genitalapparat der Stute übertragen wurden. Obwohl bereits am 3. d.p.inf. aus Uterus- und Zervixtupfern große Taylorellenkolonien angezüchtet werden konnten, zeigte die Ponystute lediglich eine leicht verstärkte Exsudation. Dieser mit den o.g. Ergebnissen von SAHU und WEBER (1982) nicht übereinstimmende klinische Verlauf der Infektion bei der Stute läßt sich mit der bei dem Deckakt stattgefundenen Reinfektion der Ponystute erklären. In den Untersuchungen von TIMONEY et al. (1979c), SAHU et al. (1980) und FRIEDRICH (1989) zeigten reinfizierte Ponystuten keine oder nur sehr milde klinische Symptome nach der Taylorelleninokulation.

Da der im Verlaufe der bakteriologischen Untersuchungen aufgetretene kleine Kolonietyp von *T. equigenitalis* von ebenfalls sehr langsam wachsenden Begleitkeimen, insbesondere coryneformen Keimen, morphologisch schwer zu unterscheiden war und demzufolge die zur Diagnose von *T. equigenitalis* erforderliche Subkultivierung zur Erzielung von Taylorellenreinkulturen stark behindert bzw. z.T. unmöglich gemacht wurde, eröffnen die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten neuen Möglichkeiten in der Identifizierung von verdächtigem Kulturmaterial. KANEMARU et al. (1988) und KAMADA et al. (1987) beschreiben ebenfalls Probleme in der Identifizierung des kleinen Kolonietyps des CEM-Erregers auf Grund der ähnlich geringen Wachstumsgeschwindigkeit von verschiedenen Begleitkeimen.

Über die Ursache des positiven Erregernachweises am 333. d.p.inf. nach der vom 131. d.p.inf. bis 319. d.p.inf. dauernden Phase mit negativen bzw. verdächtigen Untersuchungsergebnissen lassen sich nur Vermutungen anstellen. Der zum bakteriologischen Nachweis von *T. equigenitalis* notwendige Gehalt an Erregern im Genitaltrakt des Hengstes könnte aus den als sexuelle Belastung anzusehenden wiederholten Absamungen des Ponyhengstes resultieren. Inwieweit dabei

Veränderungen im Hormonstatus bzw. Veränderungen in der physiologischen Genitalflora eine Rolle spielen, bedarf weiterer Untersuchungen.

Die zwischen 2 (großer Kolonietyp) und 9 Tagen( kleiner Kolonietyp) liegende Wachstumszeit der Taylorellenkolonien weist auf den möglichen Zeitaufwand beim Nachweis von *T. equigenitalis* aus Tupferproben von Hengsten hin. Die in den Primärisolationsversuchen von WARD et al. (1984) bei 39 % der Isolate notwendige Inkubationszeit betrug ebenfalls mehr als 6 Tage.

In beiden Versuchsabschnitten traten bei beiden Ponyhengsten keine klinische Symptome, die mit der *T.-equigenitalis*-Infektion in Verbindung stehen könnten, auf.

Diese Beobachtungen decken sich bis auf eine Publikation von LORIN et al. (1984) mit dem im internationalen Schrifttum beschriebenen symptomlosen Verlauf der CEM beim Hengst (PLATT et al. 1978, TAYLOR et al. 1978, TAINTURIER et al. 1979, 1981a, 1982a, ECKSTEIN 1983, ODA et al. 1983, VAISSAIRE et al. 1986, 1987, KÖHLER 1987).

LORIN et al. (1984) beobachteten bei einem infizierten Hengst eine einseitige, hochgradig schmerzhaft, indurierende und therapeutisch gut beeinflussbare Orchitis, bei gleichzeitigem Nachweis von Mykoplasmen im Ejakulat. Die Frage, auf welchen der beiden genannten Erreger dieses Krankheitsbild ätiologisch jedoch zurückzuführen ist, bleibt jedoch offen.

### **Ergebnisse der hämatologischen und serologischen Untersuchungen**

In der hämatologischen Überwachung beider Ponyhengste konnten über den gesamten Versuchszeitraum im roten und weißen Blutbild Ergebnisse ermittelt werden, die mit einigen Ausnahmen in den Grenzen der von KOLLAKOWSKI und KELLER (1990) und KIEFERNDORF und KELLER (1990) ermittelten Normwerte liegen. Beim Ponyhengst 1 trat am 7. d.p.inf. eine Leukopenie mit Linksverschiebung auf, die aus einer Auseinandersetzung der zellulären Abwehr des Organismus mit einem Antigen resultieren kann. Die beim zweiten Ponyhengst am 240. d.p. inf. nachgewiesene Leukopenie mit Linksverschiebung ist weniger mit der *T.-equigenitalis*-Infektion als vielmehr mit der am 237. und 238. d.p.inf. aufgetretenen leichten Kolik in Zusammenhang zu sehen.

Die Ergebnisse der hämatologischen Untersuchung unterstreichen den Charakter der CEM, als eine lokale Infektion der Genitalschleimhäute und stehen im Einklang mit der bei beiden Ponyhengsten während des gesamten Versuchszeitraumes, mit

Ausnahme der leichten Kolikerkrankung des Ponyhengstes 2, unbeeinträchtigten klinischen Verfassung.

Die serologischen Reaktionen in der SLA, dem HT und IFT bei beiden Versuchshengsten sind als unspezifische Reaktionen anzusehen.

Die im IFT bei beiden Hengsten bis zu einer Serumverdünnung von 1:10 sind nach den Untersuchungen von TAINTURIER et al. (1981b) als negativ zu bewerten. Die genannten Autoren wiesen fluoreszierende Antikörper bei Pferden (Stuten und Hengste) ohne jeglichen Kontakt mit *T. equigenitalis* bis zu einer Serumverdünnung von 1:10 nach und legten nach Vergleich dieser Seren mit Seren von infizierten Stuten die Titergrenze für den IFT bei einer Titerstufe von 1:20 fest.

Die Tatsache, daß bereits am Tag der Infektion der Ponyhengst 1 in einer Serumverdünnung von 1:10 im IFT reagierende Antikörper hatte, spricht für die Richtigkeit dieser Festlegung. Die von TAINTURIER et al. (1981a) im Serum zweier artifiziell infizierter Ponyhengste in der Serumverdünnung von 1:5 und 1:10 beobachteten fluoreszierenden Antikörper wurden ebenfalls als negative Reaktion angesehen.

Die in der SLA und dem HT zu beobachtenden Agglutinationsreaktionen in den Serumverdünnungsstufen sind in Hinblick auf das internationale Schrifttum ebenfalls als negativ einzuordnen.

BENSON et al. (1978) und DAWSON et al. (1978) betrachteten nach serologischen Untersuchungen Agglutinationsreaktionen in der SLA ab einer Serumverdünnung von 1:80 als positiv.

MACMILLAN und KIDD (1986) fanden gleichartige Agglutinationsreaktionen in Pferdeseren, ohne daß ein CEM-Kontakt dieser Tiere bekannt war. Von den getesteten Seren reagierten 86 %, davon 19% in Serumverdünnungen von 1:40 und darüber. Diese positiven Reaktionen konnten im Coombs-Test nicht verstärkt werden und erwiesen sich gegenüber 2-Merkapto-Ethanol sensibel. Aus diesen Gründen wurden die positiven Agglutinationsreaktionen auf die unspezifische IgM-Bindung zurückgeführt.

Obwohl positive Antikörperrnachweise in der KBR durch PITRE et al. (1979) und in der PHA durch SCHLÜTER et al. (1990) bei bakteriologisch positiven Hengsten gelangen, konnten im durchgeführten Infektionsversuch bei beiden Ponyhengsten auch mit diesen serologischen Nachweisverfahren keine Serumantikörper nachgewiesen werden.

## Ergebnisse der postmortalen Untersuchungen

In den postmortalen bakteriologischen und immunhistologischen Untersuchungen konnte *T. equigenitalis* aus den regionalen Lymphknoten weder kulturell noch immunhistologisch nachgewiesen werden.

Da gleichartige Untersuchungen am Hengst bisher nicht durchgeführt wurden, kann lediglich auf die Ergebnisse von ACLAND et al. (1983) verwiesen werden, die das CEM-Bakterium in den zum Genitaltrakt der Stute gehörenden Lymphknoten fluoreszenzserologisch nachwiesen und daraus die Grundlage für die serologische Reaktion der Stute ableiteten.

Die negativ verlaufenen bakteriologischen Untersuchungen von Niere, Nierenbecken, Harnleiter, Nebenhodenkörper, Samenleiter und Bulbourethraldrüsen konnten durch negativ verlaufene immunhistologische Ergebnisse erhärtet werden.

In den Kulturen, die von den Harnblasen, Hoden, Nebenhodenköpfen, Nebenhodenschwänzen beider Ponyhengste sowie in den Samenleiterampullen des Ponyhengstes 1 und der Prostata und Samenblase des Ponyhengstes 2 angelegt wurden, gelang es nach der Anfertigung von Grampräparaten von verdächtigem Koloniematerial vereinzelt zarte gramnegative, morphologisch für *T. equigenitalis* sprechende Stäbchen bzw. kokkoide Bakterien nachzuweisen. Da die weitere Kultivierung dieser Bakterien mißlang und in immunhistologischen Untersuchungen positive Ergebnisse lediglich bei der Untersuchung des Hodens und der Samenblase des Ponyhengstes 2 beobachtet wurden, lassen sich über die Identität der mikroskopisch in den o.g. Organen nachgewiesenen gramnegativen Bakterien nur Vermutungen anstellen.

Neben der Möglichkeit, daß es sich bei den beobachteten Bakterien tatsächlich um Taylorellen gehandelt hat, die sich in den Organen mit verdächtigen bakteriologischen Befunden auf einem quantitativ sehr niedrigen Niveau angesiedelt hatten, sind in Auswertung der Literatur auch andere Bakterienspezies in die differentialdiagnostischen Überlegungen einzubeziehen.

Nach MACKINTOSH (1981) sind andere mikroaerophil wachsende gramnegative zarte Stäbchen oder kokkoide Bakterien, wie *Haemophilus*-, *Neisseria*-, *Branhamella* und *Bordetella*spezies, in den differentialdiagnostischen Betrachtungen zu berücksichtigen. Diese genannten Arten wurden aber bisher nur sehr selten von Stuten isoliert. Die beim Hengst auf den Schleimhäuten des Genitaltraktes auftretende Spezies *Moraxella urethralis* läßt sich trotz ihres gramnegativen Färbeverhaltens auf Grund der mikroskopisch zu beobachtenden Anordnung in Ketten- oder

Diploform gut von *T. equigenitalis* abgrenzen.

Die positiven postmortalen Erregernachweise in der gesamten Urethra, den primären und sekundären Eichelgruben, der Eichel und dem Penisschaft zeigen, daß beim Hengst in erster Linie das äußere Genitale besiedelt werden. Ausgehend von der in den prä- und postmortalen bakteriologischen Untersuchungen gemachten Beobachtungen über das Niveau der Taylorellenkolonisation werden die primäre und die sekundären Eichelgruben als Hauptkolonisationsort bestätigt. Die Erregerbesiedlung der Urethra, der äußeren Schleimhaut der Eichel und des Penisschaftes verläuft dabei auf einem niedrigen quantitativen Niveau.

Der mikroskopische Nachweis zarter gramnegativer Stäbchen und kokkoider Bakterien in der postmortalen bakteriologischen Untersuchung des Hodens sowie das vereinzelte Auftreten spezifischer, für eine Bindung von Antikörpern des Kaninchenimmenserums und des mAK TF III 11E5 sprechender Fluoreszenzen an antigenhaltige Strukturen im Lumen der Hodenkanälchen im IFT weisen auf eine jedoch quantitativ geringe Ansiedlung des CEM-Erregers in den Hoden des Ponyhengstes 2 hin.

Da durch LAPAN (1990) nach der in-vitro-Einwirkung der Extrakte von 56 *T. equigenitalis*-Stämmen auf Vero- und Y1-Zellen morphologische Veränderungen beobachtet wurden, sind durch *T. equigenitalis* gebildete Zytotoxine als Ursache für die degenerativen Veränderungen am Keimepithel in Betracht zu ziehen.

Die im immunhistologischen Erregernachweis in der Samenblase beobachteten Fluoreszenzen mit gleicher Lokalisation bei der Anregung mit grünem bzw. ultravioletttem Licht, die aus einer Bindung von Antikörpern des Kaninchenimmenserums und des verwendeten mAK resultieren, können als Bestätigung des in der bakteriologischen Untersuchung dieser akzessorischen Geschlechtsdrüse ausgesprochenen Verdachts hinsichtlich einer Kolonisation von *T. equigenitalis* betrachtet werden. Das quantitative Niveau der Erregeransiedlung ist, wie beim Hoden als sehr gering einzuschätzen.

Aus der Analyse der Literatur heraus existieren ebenfalls mehrere Hinweise über eine mögliche Besiedlung der akzessorischen Geschlechtsdrüsen durch *T. equigenitalis*.

In Untersuchungen über Virulenzfaktoren des CEM-Erregers durch LAPAN (1990) war es möglich, die Fähigkeit einer D-Mannose-resistenten Adhäsion bei 47,3% der 56 geprüften *T. equigenitalis*-Stämme nachzuweisen. Die nachgewiesene Adhäsionsfähigkeit, die bei einer Vielzahl von schleimhautbesiedelnden pathogenen

Bakterien vorhanden ist, wäre in diesem Zusammenhang als Grundvoraussetzung einer Besiedlung der Genitalschleimhäute durch *T. equigenitalis* anzusehen.

Ein weiterer Hinweis ist die von PAAR (1990) im ELISA in 98,8 % der untersuchten Vorsekrete nachgewiesene IgA-Aktivität gegen *T. equigenitalis*. Diese kann aus der Besiedlung der Schleimhäute des Genitalapparates durch *T. equigenitalis* resultieren.

In der Literatur existieren lediglich durch PLATT et al. (1978) Ergebnisse post-mortaler bakteriologischer Untersuchungen an einem am 22. d.p.inf. euthanasierten Ponyhengst. Die Autoren isolierten das CEM-Bakterium aus der distalen Urethra, der primären Eichelgrube und dem Präputium und schlossen aus ihren Ergebnissen, daß eine ascendierende Taylorelleninfektion nicht stattgefunden hatte.

In der pathologisch-anatomischen Untersuchung der entnommenen Organe der beiden Ponyhengste waren keine pathologischen Veränderungen an den äußeren und inneren Abschnitten des Geschlechtsapparates und an den Teilen des Harnapparates zu beobachten. In der histopathologischen Untersuchung der Organe genannter Organsysteme waren beim Ponyhengst 1 ebenfalls keine Hinweise auf entzündliche Veränderungen zu beobachten.

Diese Ergebnisse entsprechen denen von PLATT et al. (1978) an einem mit *T. equigenitalis* infizierten und am 22. d.p.inf. euthanasierten Ponyhengst. Die Autoren beschreiben lediglich eine milde nichtspezifische testikuläre Degeneration.

Konträr zu den Ergebnissen der histopathologischen Untersuchungen des Ponyhengstes 1 wurden bei gleichartigen Untersuchungen am 2. Ponyhengst abweichende Befunde in den Hoden, Nebenhoden, Samenblasen, im Bereich der Urethra und der sekundären Eichelgruben erhoben. Die bei Ponyhengst 2 im Hoden histopathologisch nachweisbaren vereinzelt Riesenzellen müssen in Zusammenhang mit der zu beobachtenden verringerten Spermiogenese gesehen werden.

Nach SEFFNER (1986) und SCHULZ (1991) treten Riesenzellen bei Störungen der Spermiogenese nach der Einwirkung unterschiedlicher Noxen infolge Meiosestörung mit Bildung hyperploider Riesenzellen auf. Einer dieser ätiologischen Faktoren können Bakterien sein.

Die abschnittsweise spermienfreien Nebenhodenkanälchen sind deshalb als Konsequenz der verminderten Spermiogenese anzusehen.

Die beim zweiten Ponyhengst in den Samenblasen, subepithelial im Bereich der Urethra und der sekundären Eichelgruben gefundenen histopathologischen Verän-

derungen in Form lokaler lympho-histiozytärer Infiltrate im Interstitium der Drüsen weisen auf eine Auseinandersetzung des lokalen Immunsystems mit einem Antigen hin.

Da jedoch *T. equigenitalis* in der Samenblase und im Hoden nur immunhistologisch nachweisbar war, ist die Wahrscheinlichkeit, daß das CEM-Bakterium für die Veränderungen in diesen beiden Organen verantwortlich war, gering.

### **Immunserumherstellung im Kaninchen**

Mit dem zur Immunisierung verwendeten Antigen konnte in Verbindung mit dem applizierten Adjuvans ein hoher Serumantikörpertiter bei allen 3 immunisierten Kaninchen induziert werden.

In der Spezifitätsprüfung mit der OSA agglutinierte das unverdünnte Sammelserum lediglich mit *Actinobacillus equuli*. Trotzdem fiel in der immunhistologischen Untersuchung der Eichelgruben mit der Doppelmarkierungstechnik auf, daß in der FITC-Anregung neben stäbchenförmigen Bakterien auch Kokken reagierten, während in der Rhodaminanregung ausschließlich Stäbchen fluoreszierten. Diese Beobachtung läßt auf eine unspezifische Reaktion des Immunserums im IFT mit kokkenförmigen Bakterien schließen. Da diese Bakterien nicht vom verwendeten mAK erkannt wurden, der mAK jedoch bei der Verwendung von Kulturmateriel sowohl mit stäbchenförmigen wie auch mit kokkoiden Formen von *T. equigenitalis* reagierte, ist demzufolge auszuschließen, daß es sich bei den vom Kaninchenimmunserum erkannten Kokken um kokkoide Formen von *T. equigenitalis* handelt.

Über Kreuzreaktionen von Immunseren, die im Kaninchen gegen *T. equigenitalis* hergestellt wurden, liegen in der Literatur verschiedene Ergebnisse vor, die im Zusammenhang mit der Spezifität der mAK diskutiert werden.

### **Ergebnisse der Charakterisierung mAK gegen *T. equigenitalis***

Die gegen *T. equigenitalis* gerichteten mAK (außer TF II 8D4) erkennen im Westernblot nach der Auftrennung in der SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen Proteine mit einem relativen Molekulargewicht von 13, 22, 35, 47, 56, 70 und 117 kD des zur Immunisierung verwendeten Taylorellenstammes. Dabei werden von den mAK TF III 11B5 und TF III 3G3 jeweils 2 Proteine im Bereich von 70 und 117 kD bzw. 47 und 70 kD erkannt.

Die in der Literatur vorliegenden Ergebnisse über immunogen wirkende Außenmembranproteine beruhen in erster Linie auf Untersuchungen unter



Verwendung polyklonaler Kaninchenimmunsere und Seren infizierter Pferde.

LAPAN (1990) wies im Westernblot mit einem polyklonalen Kaninchenserum nach SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen verschiedene immunogene Proteine im Molekulargewichtsbereich von 14 bis 130 kD bei allen der 56 untersuchten T.-equigenitalis-Stämme nach. Da die Autorin jedoch keine Molekulargewichte der einzelnen vom Immunsere erkannten Proteine angibt, kann der Vergleich mit den eigenen Ergebnissen nur über Schätzungen erfolgen. Demnach wurden ein 14-, 22-, 39-, 43-, 45-, 48-, 53-, 57- und 130-kD-Protein durch das Kaninchenserum erkannt.

SUGIMOTO et al. (1988) isolierten die Außenmembran von T. equigenitalis und ermittelten in der SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen Hauptproteine mit einem Molekulargewicht von 15, 27, 33, 41, 48, und 50 kD. Die Autoren konnten mit dem Westernblot in der Gegenüberstellung der Reaktion der Seren von Stuten, die vor und nach der T.-equigenitalis-Infektion entnommen wurden, eine für die Infektion mit T. equigenitalis spezifische Reaktion des 41-kD-Proteins nachweisen.

Da im ELISA natives Antigenmaterial verwendet wurde, erfolgte die Selektion der antikörperproduzierenden Hybridomzellen hinsichtlich der Fähigkeit der murinen Antikörper, immunogen wirkende Oberflächenstrukturen von T. equigenitalis zu erkennen. Mit Hilfe der mAK TF III 11E5 und TF I 10D5 gelang es, erstmalig Unterschiede in der Antigenstruktur verschiedener T.-equigenitalis-Isolate nachzuweisen. Der mAK TF III 11E5 reagierte nicht mit dem nach LAPAN (1990) zur DNA-Fingerprint-Gruppe I gehörenden Taylorellienstamm I/3 im ELISA, während alle anderen untersuchten Stämme mit nur geringen quantitativen Unterschieden in der gemessenen Extinktion durch den Antikörper erkannt wurden. Desweiteren wurde der Taylorellienstamm BW/26 vom mAK TF I 10D5 ebenfalls im ELISA nicht erkannt. Die übrigen getesteten T.-equigenitalis-Isolate erkannte der mAK TF I 10D5, es waren aber deutliche Unterschiede in der gemessenen Extinktionen zu verzeichnen.

Die anderen 6 selektierten mAK wurden zwar von allen geprüften Taylorellenstämmen gebunden, es traten jedoch zum Teil sehr deutliche Differenzen in den gemessenen Extinktionen auf. Da im verwendeten Testsystem gleiche Antigen- und Antikörpermengen eingesetzt wurden, weisen diese Differenzen auf quantitative wie auch qualitative Unterschiede in der Zusammensetzung der durch die mAK erkannten Epitope hin. Der quantitative Unterschied zwischen den T.-equigenitalis-Isolaten könnte in einer zahlenmäßig unterschiedlichen Expressierung

bestimmter Epitope bestehen, während qualitative Differenzen auf eine unterschiedliche Affinität der mAK zu den der erkannten Epitope der einzelnen geprüften T.-equigenitalis-Stämme zurückzuführen wären.

In der zur Verfügung stehenden Literatur liegen Angaben über ähnliche Untersuchungen mit mAK bisher nicht vor.

In vergleichenden Untersuchungen durch LAPAN (1990) wurden mittels SDS-PAGE 56 T.-equigenitalis-Stämme hinsichtlich ihres Proteinmusters verglichen. Alle geprüften Stämme zeigten dabei weder qualitative noch quantitative Unterschiede im Proteinmuster.

In bisher durchgeführten immunologischen Studien über die Antigenzusammensetzung des CEM-Erregers wurden lediglich polyklonale Immunsereen vom Kaninchen verwendet, die sowohl in der SLA, der Co-Agglutination, wie auch der OSA keine immunologischen Unterschiede zwischen den getesteten Taylorella-Stämmen erkennen ließen (TAYLOR et al. 1978, KITZROW et al. 1979, DABERNAT et al. 1980b, MAZUROWA 1985, KAMADA et al. 1987, SELBITZ et al. 1987).

Im IFT konnten TER LAAK und WAGENAARS (1990) unter Verwendung eines Immunsereums von der Ziege bei keinem der 20 geprüften T.-equigenitalis-Stämme serologische Unterschiede beobachten.

CORBEL und BREWER (1982) wiesen mit polyklonalem Kaninchenimmunsereum an Ultraschall- und Phenolextrakten von 5 T.-equigenitalis-Stämmen in der Immunelektrophorese 11 präzipitierende Antigene mit Proteincharakter nach, ohne daß dabei Unterschiede zwischen den verwendeten Isolaten erkennbar waren.

LAPAN (1990) gelang es ebenfalls nicht, mit einem in Kaninchen erzeugten Immunsereum im Immunoblot Unterschiede in der Antigenstruktur von 56 Isolaten nachzuweisen.

Aus der ELISA-Reaktion der mAK mit den Vertretern der nach LAPAN (1990) nachgewiesenen Genomgruppen konnten bisher keine Beziehungen zwischen Genomgruppe und Reaktion des mAK aufgezeigt werden. Die Frage, inwieweit die unterschiedlichen Reaktionen der selektierten mAk mit den geprüften T.-equigenitalis-Isolaten zur Einteilung von T.-equigenitalis-Stämmen in verschiedene Antigengruppen herangezogen werden können, bleibt offen. Um die Möglichkeit der Nutzung der mAk als epidemiologische Marker zu prüfen, ist die Testung ihrer Reaktion mit einer größeren Anzahl von T.-equigenitalis-Stämmen notwendig.

Die fehlende Reaktion des mAK TF II 8D4 im Immunoblot kann verschiedene Ursachen haben, die in weiteren Untersuchungen ermittelt werden müßten. Eine der möglichen Ursachen wäre, daß dieser mAK ein diskontinuierliches Epitop

erkennt, d.h. ein Epitop auf der Zellmembranoberfläche, welches nach der denaturierenden Behandlung der Bakterienzellen mit SDS aufgrund der Zerstörung der Tertiärstruktur seine antigenen Eigenschaften verliert. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß dieser Antikörper gegen in Zellwänden gramnegativer Bakterien stark vertretene Lipopolysaccharide (LPS) gerichtet ist.

Daß LPS an der von *T. equigenitalis* erzeugten Immunreaktion beteiligt sind, konnte durch Untersuchungen von CORBEL und BREWER (1982) und SUGIMOTO et al. (1988) nachgewiesen werden. CORBEL und BREWER (1982) wiesen mit einem Kaninchenimmunserum ein LPS-Protein-Antigen und ein Polysaccharid-Antigen nach. SUGIMOTO et al. (1988) wiesen in der Kreuzimmunelektrophorese mit Seren infizierter Stuten ein auf der Außenmembran lokalisiertes immunogen wirkendes LPS und eine ebenfalls immunogen wirkende Nicht-LPS-Komponente nach, die nach Meinung der Autoren den von CORBEL und BREWER (1982) nachgewiesenen Komponenten entsprechen.

In der Abklärung möglicher Kreuzreaktionen der selektierten 8 verschiedenen mAK mit Vertretern unterschiedlicher Bakteriengattungen traten im ELISA keine spezifischen immunologischen Reaktionen auf, wobei eine Aussage über Antigengemeinschaften von *T. equigenitalis* mit *Streptococcus equi* bzw. *Streptococcus zooepidemicus* auf Grund der unspezifischen Bindung des benutzten POD-Konjugates durch die letztgenannten Bakterienspezies nicht getroffen werden kann.

In der Literatur wird wiederholt von verschiedenen Autoren über Kreuzreaktionen von gegen *T. equigenitalis* erzeugten Immunsereen mit verschiedensten Bakterien berichtet, bzw. aus den immunologischen Reaktionen humaner und boviner Seren mit *T. equigenitalis* auf Antigengemeinschaften zwischen dem CEM-Erreger und anderen im ~~humanen~~ bzw. bovinen Genitaltrakt vorkommenden Bakterien geschlossen wurde.

TAYLOR et al. (1978) wiesen mit einem Immunserum von Kaninchen in der Röhrchenagglutination in einer Serumverdünnung von 1:10 bis 1:20 Kreuzreaktionen mit *Brucella abortus*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus influenzae*, *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica* nach. Das Serum reagierte ebenfalls in der OSA unverdünnt mit *Moraxella osloensis* (NCTC 10465) und *Actinobacillus*spezies (NCTC 10803) bzw. bis zu einer 1:2 Verdünnung mit *Haemophilus influenzae*murium (NCTC 11135), *Neisseria elongata* subspezies *glycolytica* (NCTC 11050) und *Pasteurella pneumotropica* (NCTC 10609). NEILL et al. (1984) beschrieben Agglutinationen eines unverdünnten Immunsereums vom Kaninchen mit *Actinobacillus*spezies NCTC (10802) und *Acinetobacter lwoffii*, einem Bakterium, welches nach VAISSAIRE et al. (1987) zur saprophytären Normalflora des Hengstes gehört.

Nach der Adsorption von Antikörpern aus einem Hyperimmunserum vom Kaninchen durch den Protein-A-positiven Staphylokokkenstamm Cowan I beobachteten KITZROW et al. (1979) in der Co-Agglutination eine schwache Reaktion mit *Haemophilus suis*.

Demgegenüber konnten DABERNAT et al. (1980b), TAINTURIER et al. (1981c), MAZUROWA (1985) und SELBITZ et al. (1987) keine Kreuzreaktionen der von ihnen in Kaninchen hergestellten Immunseren mit anderen Bakterienspezies nachweisen.

Die Reaktion der mAk im IFT zeigte die bei allen mAk in unterschiedlicher Intensität vorhandene Fähigkeit, in diesem immunologischen Nachweisverfahren mit *T. equigenitalis* zu reagieren. Dabei haben sich der mAK TF II 8D4 und TF III 11B5 als besonders geeignet für die Anwendung im IFT herauskristallisiert.

Mit der Etablierung von Hybridomzellen, die gegen *Taylorella equigenitalis* gerichtete mAK produzieren, eröffnen sich neue Wege in der Erforschung der Epidemiologie dieser equinen Genitalerkrankung. Da die mAK TF II 8D4 und TF III 11B5 alle geprüften Tayorellenstämme im ELISA erkennen, keine Kreuzreaktionen mit bisher getesteten Bakterienspezies zeigten und diese Antikörper in der Lage sind, im IFT zu reagieren, besteht die Möglichkeit, einen auf dem IFT basierenden Schnelltest zur Untersuchung von Ausstrichen von Genitaltupferproben und Genitalsekreten von Hengst und Stute auf *T. equigenitalis* zu etablieren. Ferner könnten diese mAk im IFT zur Identifizierung verdächtigen Kulturmaterials, welches, wie auch der durchgeführte Infektionsversuch zeigte, bei symptomlosen *T.-equigenitalis*-Trägern die Diagnose erschwert, herangezogen werden. Dazu wäre die Identifizierung der vom mAK TF II 8D4 erkannten antigenen Determinante des CEM-Bakteriums notwendig.

TER LAAK et al. (1989) und TER LAAK und WAAGENAARS (1990) setzten bereits ein in Ziegen entwickeltes Hyperimmunserum zur Identifizierung von *T.-equigenitalis*-Kulturen, die unter bestimmten Kultivierungsbedingungen autoagglutinierten, ein. Diese Methode der Identifizierung verdächtiger Bakterien könnte mit dem Einsatz mAk spezifischer werden.

Um ein noch genaueres Bild von der Spezifität der im Rahmen dieser Arbeit geschaffenen mAK zu bekommen, sind weitere vergleichende Untersuchungen mit bisher noch nicht getesteten Bakterienspezies, die in der Literatur als kreuzreagierend beschrieben wurden, durchzuführen. In diesem Zusammenhang wäre auch die Untersuchung möglicher Antigengemeinschaften von *T. equigenitalis* mit Bakterien der physiologischen Genitalflora von Hengst und Stute

nach deren bakteriologischer Anzucht von Interesse.

Desweiteren wären Untersuchungen über Antigengemeinschaften von *T. equigenitalis* mit den menschlichen Genitaltrakt besiedelnden pathogenen und opportunistischen Bakterienspezies, die als Ursache der Reaktion von *T. equigenitalis* mit Humansenen betrachtet werden, möglich.

## 6. Schlußfolgerungen

In Infektionsversuchen mit Shetlandponys konnte die sexuelle Übertragbarkeit von *Taylorella equigenitalis* demonstriert werden, indem das CEM-Bakterium von einer Ponystute auf einen Ponyhengst und von einem Ponyhengst auf eine Ponystute übertragen wurde.

Da in den bakteriologischen Untersuchungen von Genitaltupferproben kein Ort am äußeren Hengstgenitale ermittelt werden konnte, von dem der Erreger beliebig reproduzierbar reisoliert werden kann, sind zur Erzielung einer hohen Nachweissicherheit beim Hengst Tupferproben vom Penischaft, den primären und sekundären Eichelgruben, der Urethra sowie das Vorsekret und das Ejakulat bakteriologisch auf *T. equigenitalis* zu untersuchen.

Da jedoch in der Gesamtheit der bei 2 Ponyhengsten durchgeführten bakteriologischen Untersuchungen *T. equigenitalis* am häufigsten aus den Eichelgrubentupfern isoliert wurde und in den postmortalen bakteriologischen Untersuchungen der Harn- und Geschlechtsorgane beider Ponyhengste sowie in der immunhistologischen Untersuchung von Organschnitten des Ponyhengstes 2 der höchste Gehalt an Taylorellen in den primären und sekundären Eichelgruben zu finden war, können die primäre und die sekundären Eichelgruben des Hengstes analog zum Klitorissinus der Stute als Hauptkolonisationsort von *Taylorella equigenitalis* im männlichen Genitaltrakt angesehen werden.

Die bei Ponyhengst 2 nach dem intensiven Absamtraining plötzlich wieder positiven Erregernachweise geben zu der Vermutung Anlaß, daß infizierte Deckhengste, die in zuchtthygienischen Untersuchungen vor Beginn der Decksaison negative Ergebnisse lieferten, infolge der sexuellen Belastung in der Decksaison den Erreger plötzlich massiv übertragen können.

Die sich in diesem Infektionsversuch in Abhängigkeit von der Koloniegröße zwischen 2 und 9 Tagen bewegendende Zeit zur Primärisolation von *T. equigenitalis*, der sich noch einige Tage zur Subkultivierung und Diagnosesicherung anschließen, macht den zeitlichen Aufwand des Erregernachweises deutlich.

Da beim Hengst als symptomlosen Träger von *T. equigenitalis* in erster Linie mit dem Auftreten des langsamwachsenden kleinen Kolonietypes zu rechnen ist, sind Kochblutagarplatten zum Taylorellennachweis bei verdächtigen Hengsten zur Vermeidung falsch negativer Ergebnisse mindestens 10 Tage zu inkubieren.

Mit Hilfe der immunhistologischen Untersuchung von Organ- und Gewebeschnitten des Ponyhengstes 2 gelang es, den in der postmortalen bakteriologischen Untersuchung ausgesprochenen Verdacht hinsichtlich der Kolonisation von *T. equigenitalis* in Hoden und Samenblasen zu bestätigen. Da mit dieser Methode des Antigennachweises erstmalig die in der Literatur immer wieder geäußerte Vermutung über die Möglichkeit der Kolonisation von *T. equigenitalis* in den inneren Geschlechtsorganen des Hengstes bestätigt wurde, bedarf die Frage, ob diese Ansiedlung des CEM-Erregers generell beim Hengst stattfindet, der Klärung.

Da bei beiden infizierten Ponyhengsten im Verlaufes des Infektionsversuches keine spezifischen Antikörper mit der SLA, dem HT, der KBR, der PHA und dem IFT nachweisbar waren, sind serologische Untersuchungen auf *T.-equigenitalis*-Antikörper zum Nachweis einer Taylorelleninfektion beim Hengst als ungeeignet anzusehen.

Die Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen bei beiden infizierten Ponyhengsten unterstreichen den lokalen und symptomlosen Charakter der *T.-equigenitalis*-Infektion beim Hengst.

Diese Aussage ist auch in Verbindung mit den unauffälligen Befunden der postmortal bei beiden Hengsten durchgeführten pathologisch-anatomischen Untersuchungen der Harn- und Geschlechtsorgane zu sehen.

Die in der histopathologischen Untersuchung der Geschlechtsorgane des Ponyhengstes 2 in der Samenblase interstitiell, in der Urethra und den sekundären Eichelgruben subepithelial nachweisbaren lympho-histiozytären Infiltrate sowie die im Hoden zu beobachtende verminderte Spermiogenese könnten als Folge der Einwirkung von *Taylorella equigenitalis* bzw. der durch diese Spezies produzierten Zytotoxine gewertet werden. Mit der beobachteten Störung in der Spermiogenese wären auch Fruchtbarkeitstörungen seitens des Hengstes infolge einer Taylorellen-

infektion weiter zu untersuchen.

Da aber die histopathologischen Untersuchungen der Geschlechtsorgane beider Ponyhengste kein einheitliches Bild lieferten, sind weitere Untersuchungen hinsichtlich der Wirkung des CEM-Erregers auf die Genitalorgane des Hengstes notwendig.

Die Tatsache, daß die mAk TF II 8D4 und TF III 11B5 alle bisher geprüften Taylorellenisolat im ELISA erkennen und gleichzeitig im IFT reagieren, lassen die Nutzung dieser beiden mAk in einem IFT-Schnelltest zur Untersuchung von Ausstrichen von Genitaltupferproben und Genitalsekreten sowie von verdächtigem Koloniematerial auf *Taylorella equigenitalis* sinnvoll erscheinen.

Die Möglichkeit der Verwendung der mAk als epidemiologische Marker zur Einteilung von *T. equigenitalis*-Isolaten in Antigengruppen auf der Grundlage ihrer verschiedenen Reaktionsmuster mit den mAk ist durch die Testung der Reaktion der selektierten mAk mit einer größeren Anzahl von *T. equigenitalis*-Stämmen zu überprüfen.

Mit Hilfe der mAk konnten im ELISA keine gemeinsamen antigenen Determinanten von 12 verschiedenen *T. equigenitalis*-Isolaten und 21 andere Bakterienspezies nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis spricht für die Spezifität der gegen *T. equigenitalis* gerichteten mAk. Dennoch sind vor dem Einsatz der empfohlenen mAk im IFT zum Nachweis von *T. equigenitalis* weitere Untersuchungen über Kreuzreaktionen mit Bakterien der physiologischen Genitalflora von Hengst und Stute durchzuführen.

## 7. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, beim Hengst den Verlauf und die Auswirkungen einer T.-equigenitalis-Infektion sowie die Orte der Kolonisation des CEM-Bakteriums zu untersuchen.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden an zwei artifiziell infizierten Shetlandponyhengsten intra vitam bakteriologische, klinische, serologische und hämatologische Untersuchungen durchgeführt. Postmortal erfolgten eine pathologisch-anatomische und histo-pathologische Untersuchung der Harn- und Geschlechtsorgane sowie regionalen Lymphknoten hinsichtlich durch T. equigenitalis induzierter Veränderungen sowie ein kultureller Erregernachweis. Die entnommenen Organe eines Hengstes wurden zusätzlich einem immunhistologischen Erregernachweis unter Verwendung eines in Kaninchen hergestellten Hyperimmunserums und gegen T. equigenitalis gerichteter monoklonaler Antikörper unterzogen. Das Hyperimmunserum und die monoklonalen Antikörper wurden zusätzlich hinsichtlich ihrer Spezifität unter Verwendung von 12 T.-equigenitalis-Isolaten und 23 anderen Bakterienspezies überprüft.

Im Infektionsversuch traten keine klinischen in Zusammenhang mit T. equigenitalis stehenden Symptome auf. In den serologischen Untersuchungen konnten in der SLA, dem HT, der PHA, der KBR und dem IFT keine T.-equigenitalis-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Ebenso ließen die Ergebnisse der hämatologischen Untersuchungen keine Rückschlüsse auf Auseinandersetzung der zellulären Abwehr des Organismus der infizierten Hengste mit dem CEM-Bakterium zu. In den bakteriologischen Untersuchungen konnten die primäre und die sekundären Eichelgruben als Hauptkolonisationsort von T. equigenitalis beim Hengst ermittelt werden.

In der immunhistologischen Untersuchung wurde T. equigenitalis mit der IFT-Doppelmarkierungstechnik in den Samenblasen und Hoden eines Ponyhengstes nachgewiesen.

Mit gegen T. equigenitalis gerichteten monoklonalen Antikörpern gelang es erstmalig, Unterschiede in der Antigenstruktur von Vertretern der Spezies T. equigenitalis nachzuweisen und neue Wege in der Erforschung der Epidemiologie dieser equinen Genitalerkrankung zu eröffnen. Die monoklonalen Antikörper erlauben es, die Diagnostik der CEM zu beschleunigen und bezüglich der Nachweissicherheit auf ein höheres Niveau zu heben.



## Tabellenanhang

## Literaturverzeichnis

1. Acland, H.M., Zellen, P.Z., Kenney, R.M. (1983): Contagious equine metritis: Distribution of organisms in experimental infection of mares. *Am. J. vet. Res.* 44(7), 1197-1202
2. Andresen, O. (1987): Smittsom metritt (CEM) behanling av infeksjon med *Taylorella equigenitalis* hos loppe og hingst. *Norsk. Vet. T.* 99(3), 193-198
3. Animal Health Yearbook 1983, Bulletin O.I.E.
4. Animal Health Yearbook 1984, Bulletin O.I.E.
5. Animal Health Yearbook 1985, Bulletin O.I.E.
6. Animal Health Yearbook 1988, Bulletin O.I.E.
7. Animal Health Yearbook 1990, Bulletin O.I.E.
8. Anonym (1978): No CEM found in humans. *Vet. Rec.* 102, 491-492.
9. Anonym (1979a): International CEM meeting. *Vet. Rec.* 105, 337-338
10. Anonym (1979): CEM on the wane. *Vet. Rec.* 105, 286
11. Anonym (1980a): A common code of practice for the control of practice of contagious equine metritis and other equine reproductive diseases for the 1981 covering season in France, Ireland and the United Kingdom. *Vet. Rec.* 107, 376-379
12. Anonym (1981): CEM code of practice for 1982. *Vet. Rec.* 109, 371
13. Anonym (1982a): A common code of practice for the control of contagious equine metritis and other equine reproductive diseases for the 1983 covering season in France, Ireland and the United Kingdom. *Vet. Rec.* 111, 474-477
14. Anonym (1982b): INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. SUBCOMMITTEE ON THE TAXONOMY OF HAEMOPHILUS, Minutes of the meeting, 3. and 4. September, 1978. *Int. J. Syst. Bact.* 32(2), 244-245
15. Anonym (1983): Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten vom 9. August 1983, BGBl. I S. 1095
16. Anonym (1984): INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. *Int. J. Syst. Bact.* 34(4), 503-504
17. Anonym (1991): Contagiose Equine Metritis (CEM). *Deutsches Tierärzteblatt* 4, 306

18. Arko,R.J. und Wong,K.H. (1980): Murine infection model for contagious equine metritis - a new venereal disease of horses. *Am. J. vet. Res.* 41(7), 989-993
19. Arzneibuch der Deutschen Demokratischen Republik, Bd. Diagnostische Laboratoriumsmethoden in der ab 1. Dezember 1983 verbindlichen FASSUNG AB (D.L.) - DDR 83 hrsg vom Minister für Gesundheitswesen aufgrund des §15 Absatz 3 des Arzneimittelgesetzes vom 5. Mai 1964 (Gesetzblatt I, S. 101). Berlin: Akademie-Verlag, 1983
20. Atherton,J.G. (1978a): Inhibition of CEM organism in mixed cultures. *Vet. Rec.* 103, 432
21. Atherton,J.G. (1978b): Isolation of CEM organism. *Vet. Rec.* 102, S. 67
22. Atherton,J.G. (1983): Evaluation of selective supplements used in media for the isolation of the causative organism of contagious equine metritis. *Vet. Rec.* 113, 299-300
23. Benson,J.A., Dawson,F.L.M., Durrant,D.S., Edwards,P.T., Powell,D.G. (1978): Serological response in mares affected by contagious equine metritis 1977. *Vet. Rec.* 102, 277-280
24. Bertram, T.A., Coignoul,F.L., Jensen, A.E. (1982): Phagocytosis and Intracellular Killing of the Contagious Equine Metritis Organism by Equine Neutrophils in Serum. *Infect. and Immun.* 37(3), 1241-1247
25. Bertram, T.A., Coignoul,F.L., Jensen, A.E. (1983): Phagocytosis and intracellular killing of the contagious equine metritis organism by equine neutrophils in genital secretions. *Am. J vet. Res.* 44(10), 1923-1927
26. Bertram,T.A. und Jensen,A.E. (1984): Responses of equine neutrophils to contagious equine metritis organism and its lipopolysaccharides. *Am. J. vet. Res.* 45, 1099-1104
27. Blaha,Th. (1990): Zur Bedeutung der epizootiologischen Charakteristika von übertragbaren Krankheiten für die Immunprophylaxe (Übersichtsreferat). *Mh. Vet.-Med.* 45, 483-487
28. Bleumink-Pluym,N., Ter Laak,E.A., Van Der Zeijst,B.A.M. (1991): Epidemiologic Study of *Taylorella equigenitalis* Strains by Field Inversion Gel Elektrophoresis of Genomic Restriction Endonuclease Fragments. *J. Clin. Microbiol.* 28(9), 2012-2016
29. Blobel,H., Kitzrow,O., Blobel,K. (1978): Contagious Equine Metritis (CEM). *Tierärztl. Umschau* 33(10), 523-524
30. Blobel,K., Grundmann,B., Schlichting,K.E. (1979): Praktische Erfahrungen mit der ansteckenden Gebärmutterentzündung der Pferde (CEM). *Prakt. Tierarzt* 60(3), 193-196

31. Blobel,H., Brückler,J., Kitzrow,O., Blobel,K. (1980): "CONTAGIOUS EQUINE METRITIS" (CEM). Prakt. Tierarzt 61(10), 41-47
32. Blobel,H. und Brückler,J. (1981): Contagious Equine Metritis. In: Blobel,H. und Schließer,T. : Handbuch der bakteriellen Infektionskrankheiten der Tiere. VEB GUSTAV FISCHER VERLAG JENA , 545-556
33. Bonjour,P. und Joubert,L. (1980): La metrite contagieuse des equides, enigme epidemiologique, realite medicale fiction prophylactique? Bull. Soc. Vet. et Med. comparee 82(2), 99-105
34. Bowen,J.M. (1978): CEM and AI. Vet. Rec. 102, 349
35. Bradfort,M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254
36. Bryans,J.T. und Hendricks,J.B. (1979): Epidemiological observations on contagious equine metritis in Kentucky, 1978. J. Reprod. Fert. Suppl. 27, 343-349
37. Brewer,R.A. (1983): Contagious equine metritis: A review/summary. Vet. Bull. 53, 881-891
38. Brewer,R.A. und Corbel,M.J. (1983): COMPARISON OF HAEMOPHILUS EQUIGENITALIS (CONTAGIOUS EQUINE METRITIS ORGANISM) AND OTHER HAEMOPHILUS SPECIES BY DISC ELECTROPHORESIS OF ACID-PHENOL-SOLUBLE PROTEINS. Br. vet. J. 139, 200-203
39. Brook,D. (1978): CEM and AI. Vet. Rec. 102, 561-562
40. Brown,B.S., Timoney,P.J. (1988): Contagious equine metritis and fluorescence. Vet. Rec. 123, 39
41. Chandler,N. (1979): Swabbing mares and stallions for CEM. Vet. Rec. 105, 561
42. Christoph,H.-J. und Meyer,H. (1970): Arbeitsmethoden des Laboratoriums in der DDR-Veterinärmedizin. Hirzel Verlag Leipzig 1970
43. Clay,J.C. und Burdon,D.W. (1980): HAEMOPHILUS EQUIGENITALIS IN SEXUALLY TRANSMITTED DISEASE. The Lancet 2, 540
44. Codazza,D., Giango,P., Proverbic,E., Lusian,F. (1980): Primo isolamento di Hemophilus equivaginalis negli allevamenti italiani. Clin. Vet. 103, 563-565
45. Corbel,M.J. und Brewer,R.A., (1980): Antibodies to Haemophilus equigenitalis in bovine sera. Vet. Rec. 106, 35
46. Corbel,M.J. und Brewer,R.A. (1982): Characterization of the major antigens of Haemophilus equigenitalis (contagious equine metritis organism). J. Hyg. 89, 529-538

47. Corbel, M.J. und Brewer, R.A. (1983): Interaction of *Haemophilus equigenitalis* (contagious equine metritis organism) with lectins. *Vet. Rec.* 112, 202
48. Crowhurst, R.C. (1977): Genital infection in mares. *Vet. Rec.* 100, 476
49. Crowhurst, R.C., Simpson, D.C., Greenwood, R.E.S., Ellis, D.R., (1979): Contagious equine metritis. *Vet. Rec.* 104, 465
50. Croxton-Smith, P., Benson, J.A., Dawson, F.L.M., Powell, D.G. (1978): A complement fixation test for antibody to the contagious equine metritis organism. *Vet. Rec.* 103, 275-278
51. Dabernat, H.J., Delmas, C.F. Tainturier, D.J., Lareng, M.B. (1980a): In vitro susceptibility of *Haemophilus equigenitalis*, the causative organism of contagious equine metritis 1977 to antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18, 841-843
52. Dabernat, H.J., Tainturner, D.J., Delmas, C.F., Ferney, J., Lareng, M.S. (1980b): ETUDE BACTERIOLOGIQUE DE *HAEMOPHILUS EQUIGENITALIS* TAYLOR 1978, AGENT DE LA METRITE CONTAGIEUSE DE LA JUMENT. *Ann. Rech. vet.* 11(3), 289-299
53. David, J.S.E., Frank, C.J., Powell, D.G. (1977): Contagious metritis. *Vet. Rec.* 101, 189-190
54. David, J.S.E., Frank, C.J., Powell, D.G. (1978): Additional recommendations for the control of contagious equine metritis 1977. *Vet. Rec.* 102, 161
55. Dawson, F.L.M., Benson, J.A., Croxton-Smith, P. (1978): The Course of Serum Antibody Development in Two Ponies experimentally infected with Contagious Metritis. *Equine vet. J.* 10(3), 145-147
56. Day, F.T., Crowhurst, R.C., Simpson, D.J., Greenwood, R.E.S., Ellis, D.R., Eaton-Evans, W. (1979): An outbreak of contagious equine metritis in 1977 and its effect the following season. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 27, 351-354
57. Dekeyser, P., Devrjese, J., Vande Plasche, M. (1987): 9 Jahre Überwachung von Kontagiöser equiner Metritis (CEM) in Belgien mit negativen Ergebnis. *Vlaams diergeneesk. T.* 56(3), 238-240
58. Dietz, O. und Wiesner, E. (1982): Handbuch der Pferdekrankheiten für Wissenschaft und Praxis. VEB GUSTAV FISCHER VERLAG JENA 708-709
59. Dingle, P.J. (1977): Contagious metritis in mares. *Vet. Rec.* 101, 214
60. Dolan, M., Cargill, C., Martin, F., Davenport, P., Franks, D., Lightfoot, J. (1984): Serological and bacteriological survey of three studs for contagious equine metritis. *Austr. vet. J.* 61(1), 17-19
61. Eaglesome, M.D. und Garcia, M.M. (1979): Contagious Equine metritis: A Review. *Can. vet. J.* 20(8), 201-206

62. Eckstein,K. (1983): Verbreitung und Bedeutung der ansteckenden Gebärmutterentzündung der Pferde (CEM '77) in der Bundesrepublik Deutschland. Vet. Med. Diss. Hannover
63. Eckstein,K., Merkt,H., Kirpal,G., Klug,E. (1983): Erhebung über die Verbreitung und Bedeutung der übertragbaren Gebärmutterentzündung des Pferdes (CEM'77) in der Bundesrepublik Deutschland. Prakt. Tierarzt 64(12), 1096-1104
64. Eguchi,M., Kuniyasu,C., Ohmae,K., Tanaka,M. (1988a): Drug-Sensitivity of *Taylorella equigenitalis* Isolated in Japan in 1985. Jpn. J. Vet. Sci. 50(2), 561-563
65. Eguchi,M., Kuniyasu,C., Kishima,M. (1988b): Passive Hemagglutination Test for Detection of Antibodies against *Taylorella* (*Haemophilus*) *equigenitalis* in Sera of Mares. Vet. Microbiol. 18, 155-161
66. Engvall,A., Holmstedt,S., Johnsson,S. (1983): Contagious equine metritis in Sweden Utbrott av smittsam metrit hos sto (CEM). Sverige/Svensk - Veterinartidning 35(2), 107-109
67. Engvall,A. (1985): Survival of Contagious Equine Metritis Organism (CEMO) in Different Transport Media as Influenced by Storage Time, Temperatur and Contaminating Flora. Ztbl. vet.-Med. B 32(6), 454-459
68. Fernie,D.S. (1978): Growth of the contagious equine metritis organism in a liquid medium. Vet. Rec. 103, 187-188
69. Fernie,D.S., Cayzer,I., Chalmers,S.R. (1979): A passive haemagglutination test for the detection of antibodies to the contagious equine metritis organism. Vet. Rec. 104, 260-262
70. Fernie,D.S., Battay,I., Walker,P.D., Platt,N., Mackintosh,M.E., Simpson,D.J. (1980): Observations on vaccine and postinfection immunity in contagious equine metritis. Res. Vet. Sci 28, 362-367
71. Flatscher,J., Awad-Masalmeh,M., Saymeister,H., Willinger,H. (1984): Isolierung des Erregers der kontagiösen equinen Metritits in Österreich. Wiener tierärztl. Monatsschrift 71(3), 85-90
72. Flemming,M.P. und Tribe,G.W. (1977): Contagious equine metritis organism. Vet. Rec. 101, 470
73. Fontijne,P., Ter Laak,E.A., Hartman,E.G. (1989): *Taylorella equigenitalis* isolated from an aborted foal. Vet. Rec. 125, 485
74. Frerking,H., Pozvari,M., Olivier,K. (1988): Untersuchungen zur CEMO-Infektion bei Warmblutstuten in Norddeutschland. Prakt. Tierarzt 69(10), 60-63
75. Friedrich,U. (1989): Bakteriologische und serologische Untersuchungen an experimentell mit *Taylorella equigenitalis* infizierten Ponystuten. Diplomarbeit, Leipzig

76. Füzi,M. (1980): HAEMOPHILI IN SEXUALLY TRANSMITTED DISEASES.  
Lancet 2, 476
77. Grunow,R., Jahn,S., Porstmann,T., Kiessig,S.S., Steinkeller, H., Steindl,F.,  
Mattanovich,D., Gürtler,L., Deinhardt,F., Kaitinger,H., von Baehr,R.(1988):  
The high efficiency, human B cell immortalizing heteromyeloma CB-F7.  
Production of human monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus.  
J. Immunol. Meth. 106, 257-265
78. Hazard,G.H., Hughes,K.L., Penson,P.J. (1979): Contagious equine metritis in  
Australia. J. Reprod. Fert. Suppl.27, 337-342
79. Hitchcock,P.J., Brown,T.M., Corwin,D., Hayes,S.F., Olszewski, A., Todd,W.J.  
(1985): Morphology of three strains of contagious equine metritis organism.  
Infect. and Immun. 48(1), 94-108
80. Hughes,K.L., Brydon,J.D., McDonald,F. (1978): Equine contagious metritis.  
Austr. vet. J. 54, 101
81. Kamada, M., Akiyama,Y., Oda, T., Fukuzawa,Y (1981): Contagious Equine  
Metritis: Isolation of Haemophilus equigenitalis from Horses with Endometritis  
in Japan. Jpn. J. Vet. Sci. 43, 565-568
82. Kamada,M., Oda,T., Fukuzawa,Y., Ohishi,H., Wada,R., Fukunaga,Y.,  
Kumanonido,T. (1983a): Contagious equine metritis: a survey on complement  
fixing antibody against Haemophilus equigenitalis in light horses in Japan. Bull.  
of Equine Res. Inst. 20, 119-125
83. Kamada,M., Oda,T., Ohishi,H., Wada,R., Fukunaga,Y., Kumanomido,T.(1983b):  
Studies on contagious equine metritis. III. Evaluation of media for isolation,  
subculture and storage of Haemophilus equigenitalis. Bull. of Equine Res. Inst.  
20, 126-132
84. Kamada,M., Kumanomido,T., Anzai,T., Kanemaru,T., Senba,H., Ohishi,H. (1986):  
Isolation and drug susceptibility of streptomycin sensitive Taylorella equigenita-  
lis from mares with metritis and infertility in Japan. Bull. of Equine Res. Inst.  
23, 55-61
85. Kamada,M., Anzai,T., Kanemaru,T., Wada,R., Kumanomido,T. (1987):  
Contagious Equine Metritis: Characterization of Small and Large Colonial  
Variants of Taylorella equigenitalis Isolated from a Laboratory Strain. Bull. of  
Equine Res. Inst. 24, 23-32
86. Kanemaru,T., Kamada,M., Anzai,T., Kumanomido,T. (1988): Contagious Equine  
Metritis: the Pathogenicity for Mares of Small and Large Colonial Variants of  
Taylorella equigenitalis Isolated from a Laboratory Strain. Equine infectious  
diseases V : proceedings of the Fifth International Conference, University Press  
of Kentucky, 155-163

87. Kikuchi,N., Tsunoda,N., Kawakami,Y., Murase,N., Kawata,K. (1982): An Outbreak of Contagious Equine Metritis in Japan: Isolation of *Haemophilus equigenitalis* from Thoroughbred Mares with Genital Infection in Hokkaido. Jap. J. vet Sci. 44, 107-114
88. Kilian,M. (1976): A Taxonomic study of the Genus *Haemophilus* with the Proposal of a New Species. J. of Gen. Microbiology 93, 9-62
89. Kirchhoff,H. (1982): Die Bedeutung der Mykoplasmen in den Genitalorganen von Rind, Pferd und Schwein. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 95(1), 121-125
90. Kirpal,G. und Bisping,W. (1980): Die bakteriologische Untersuchung von Genital-tupfern auf den Erreger der kontagiösen equinen Metritis CEM. Deutsche Tierärztl. Wschr. 87(11), 401-403
91. Kitzrow,H.G., Brückler,J., Blobel,H. (1979): Serologischer Nachweis der "Contagious Equine Metritis" (CEM) Bakterien unter Verwendung protein-A-Kitzrow,H.D. und Blobel,K. (1980): Contagious Equine Metritis. Prakt. Tierarzt 62, 41-43
93. Klug,E., Merkt,H., Kirpal,G., Flüge,A. (1980): Maßnahmen zur Eindämmung eines akuten Auftretens der kontagiösen equinen Metritis (CEM '77) im Bereich einer staatlichen Deckstelle. Deutsche Tierärztl. Wschr. 87(5), 158-163
94. Knowles,R.C., Hendricks,J.B., Kings,D.D., Hourrigan,J.L. (1978): Contagious Equine Metritis: A transmissible disease with international implications. Modern. Vet. Practice 59, 819-822.
95. Köhler,B. (1987): Ansteckende Gebärmutterentzündung des Pferdes. In: Beer,J.: Infektionskrankheiten der Haustiere. VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 605-606
96. Köhler,G. und Milstein,C. (1976): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256, 495-497
97. Kuller, H.-J.(1983): Kontagiöse equine Metritis. In: Küst,D. und Schaetz,F.: Fortpflanzungsstörungen bei den Haustieren. VEB GUSTAV FISCHER VERLAG JENA, 279-280
98. Lapan,G.E. (1990): Untersuchungen an *Taylorella equigenitalis*. Zellwandproteine, Genomfingerprints, Plasmide, Adhäsion und Toxizität. Vet. Med. Diss. Wien
99. Lignieres,R. (1980): Observation on the occurrence of equine contagious endometritis in France. Bull. de l'Academie Vet. de France 53(2), 323-332
100. Lindmark,D.G., Jarroll,E.L., Timoney,P.J., Shine,S.J. (1982): Energy metabolism of the contagious equine metritis bacterium(*Haemophilus equigenitalis*). Infect. and Immun. 36(3), 531-534
101. Lorin,D., Prilhofer,K., Arbeiter,K. (1984): Nachweis der kontagiösen equinen Metritis (CEM) in Österreich. Wiener tierärztl. Monatsschrift 71(3), 81-85



102. Luciano Cousinet, Larguina (1981): Auftreten und Bekämpfung von "Haemophilus equigenitalis" in einem Trabergestüt. Vet. Med. Diss. Gießen
103. Lüning, J., Klug, E., Gans, J., Mattos, R. (1983): Exportuntersuchungen von Exportpferden nach Nordamerika gemäß den CEM-Bestimmungen der Importländer. Prakt. Tierarzt 64(6), 485-491
104. Mackintosh, M.E. (1981): Bacteriological techniques in the diagnosis of equine genital infections. Vet. Rec. 108, 52-55
105. Mardh, P.A., Holst, E., Taylor-Robinson, D., Taylor, C.E.D., Rosenthal, R.O. (1980): ANTIBODIES TO HAEMOPHILUS EQUIGENITALIS IN PATIENTS WITH URETHRITIS. The Lancet 2, 310-311
106. Mazurova, J. (1984): Nahazliry zenet delohy hlison: isolace a identifikace puredce. Veterinarstvi 34, 554-555
107. Mazurova, J. (1985): Serological diagnosis of Haemophilus (Taylorella) equigenitalis by the rapid slide agglutination and coagglutination methods. Veterinarni Medicina 30(4), 247-254
108. Mc Millan, A.P., Kidd, S.A. (1986): Antibodies reactive with Taylorella equigenitalis in equine sera. Vet. Rec. 118, 209
109. Mehle, J., Brglez, I., Petac, D., Bols, V., Laban, M., Bozic, M., Vojtkovsky, R. (1984): Kontagiozni metritis kobila u Jugoslaviji. Vet. Glasnik 38(9-10), 757-763
110. Michajlov, N.N., Kataeva, V.M., Lalin, A.D., Stefan, M.K. (1988): Kontagiozni metrit losandei. Veterinaria 1, 34-38
111. Moore, W.E., Cato, E.P., Moore, L.V.H. (1985): Index of the Bacterial and Yeast Nomenclatural Changes Published in the International Journal of Systematic Bacteriology since the Approved List of Bacterial Names (1 January 1980 to 1 January 1985). Int. J. Syst. Bact. 35(3), 382-407
112. Müller, R. und Kühler, W. (1985): Tierseuchenmeldesystem, Internationales - Eine wichtige Aufgabe des Internationalen Tierseuchenamtes (O.I.E.) in Paris. Mh. Vet.-Med. 40, 363
113. Mumme, J. und Ahlswede, L. (1979): Nachweis von Haemophilus equigenitalis im Zervixutpfer einer Warmblutstute. Deutsche Tierärztl. Wschr. 86(7), 257-259
114. Nakashiro, H., Naruse, M., , C., Isayama, Y., Kuniyasu, C. (1981): Isolation of Haemophilus equigenitalis from an aborted equine fetus. Nat. Inst. Anim. Health Q. 21(4), 184-185
115. Neill, S.D., O'Brien, J.J. Mc Murray, C.H., Blach-Flower, W.J. (1984): Contagious equine metritis - use of gas liquid chromatography in identifying the causal agent. Equine vet. J. 16(5), 430-434
116. O'Brien, J.J. (1982): CEM in Northern Ireland. Vet. Rec. 111, 400

117. O'Driscoll, J. (1977): Veneral Infektion in Thoroughbreds with *Bacillus proteus mirabilis*. Vet. Rec. 100, 534
118. Oda, T., Ohwa, Y., Kamada, M. (1983): Contagious equine metritis: clinical aspect and clinical countermeasure of control in the first outbreak of the disease in Japan. Bull. of Equine Res. Inst. 20, 144-147
119. Paar, F. (1989): Nachweis von Antikörpern gegen Genitalinfektionserreger in Samen und Vorsekreten von Hengsten mittels ELISA. Vet. Med. Diss. Hannover
120. Peters, J.H. und Baumgarten, H. (1990): Monoklonale Antikörper, Herstellung und Charakterisierung. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, Paris, Tokyo, Hong Kong
121. Pierson, R.E., Sahu, S.P., Dardiri, A.H., Wilder, F.W. (1978): Contagious equine metritis: clinical description of experimental infection. J. Am. vet. med. Ass. 173(4), 402-404
122. Pitre, J., Legendre, M.F., Voisin, G. (1979): Informations et réflexions microbiologique et sérologique de la métrite coccobacillaire des équides. Prat. vet. Equine 11, 11-26
123. Platt, H., Atherton, J.G., Simpson, D.J., Taylor, C.E.D., Rosenthal, R.O., Brown, D.F.J., Wraghitt, T.G. (1977): Genital infection in mares. Vet. Rec. 101, 20
124. Platt, H., Atherton, J.G., Simpson, D.J. (1978): The Experimental Infection of Ponies with CONTAGIOUS EQUINE METRITIS. Equine vet. J. 10(3), 153-159
125. Powell, D.G. (1978): Contagious Equine Metritis. Equine vet. J. 10(1), 1-4
126. Powell, D.G., David, J.S.E., Frank, C.J. (1978): Contagious equine metritis - the present situation reviewed and a revised code of practice for its control. Vet. Rec. 103, 399-402
127. Powell, D.G. (1981): Contagious Equine Metritis. Advances in veterinary Science and comparative Medicine 25, 161-184
128. Ricketts, S.W. und Wingfield-Digby, N.J. (1981a): Clitoral sinusectomy - a transatlantic farce? Vet. Rec. 110, 322
129. Rogerson, B.A., Condron, R.J., Baker, J., Cravan, J.A. (1984): Experimental infection of mares with *Haemophilus equigenitalis*. Austr. vet. J. 61(12), 392-395
130. Rommel, F.A., Dardiri, A.H., Sahu, S.P., Pierson, R.E. (1978): Serological identification of the bacterial agent of contagious equine metritis. Vet. Rec. 103, 564
131. Rommel, F.A. und Sahu, P.S. (1981): CONTAGIOUS EQUINE METRITIS: ANTIBODY RESPONSE OF EXPERIMENTALLY INFECTED PONY MARES. Veterinary Immunology and Immunopathology 2, 201-213

132. Rossdale, P.D. (1978): Artificial insemination to help control CEM. *Vet. Rec.* 102, 291
133. Rossdale, P.D., Hunt, M.D.N., Peace, C.K., Hopes, R., Ricketts, S.W., Wingfield-Digby, N.J. (1979): CEM - the case for AI. *Vet. Rec.* 104, 536
134. ROSSAU, R., KERSTERS, K., FALSEN, E., JANTZEN, E., SEGERS, P., UNION, A., NEHLS, L., DE LEY, J. (1987): *Oligella*, a new genus including *Oligella urethralis* comb. nov. (formerly *Moraxella urethralis*) and *oligella ureolytica* sp. nov. formerly CDC group IVe): relationship to *Taylorella equigenitalis* and related taxa. *Int. J. Syst. Bact.* 37(3), 198-210
135. Sahu, S.P., Dardiri, A.H., Rommel, F.A., Pierson, R.E. (1979): Survival of Contagious Equine Metritis Bacteria in Transportmedia. *Am. J. vet. Res.* 40(7), 1040-1042
136. Sahu, S.P. (1980): CEM bacteria. *Vet. Rec.* 107, 432
137. Sahu, S.P. (1981): CONTAGIOUS EQUINE METRITIS: EFFECT of VACCINATION on CONTROL of the DISEASE. *Am. J. vet. Res.* 42(1), 45-48
138. Sahu, S.P. und Dardiri, A.H. (1980a): Contagious Equine Metritis: Isolation and Characterization of the Etiologic Agent. *Am. J. vet. Res.* 41(9), 1379-1382
139. Sahu, S.P., Pierson, R.E., Dardiri, A.H. (1980b): Contagious Equine Eetritis: Effect of Intrauterin Inoculation of Contagious Equine Metritis Agent in Pony Mares. *Am. J. vet. Res.* 41, 5-9
140. Sahu, S.P. und Weber, S. (1982): Contagious equine metritis: effect of intrauterine inoculation fo tiny colony forms in pony mares. *Vet. Rec.* 110, 250-251
141. Sahu, S.P., Wool, S., Breese, S.S. (1982): Observation on the morphology of contagious equine metritis bacterial colonies isolated from infected pony mares. *Am. J. vet. Res.* 43(5), 796-800
142. Sahu, S.P., Rommel, F.A., Fales, W.H., Hamdy, F.H., Swerczek, T. W., Youngquist, R.S., Bryans, J.T. (1983): Evaluation of various serotests to detect antibodies in ponies and horses infected with contagious equine metritis bacteria. *Am. J. vet. Res.* 44, 1405-1409
143. Schlüter, H., Kuller, H.-J., Friedrich, U., Selbitz, H.-J., Marwitz, T., Beyer, C., Ullrich, E. (1991): Zur Epizootiologie und Therapie der kontagiösen equinen Metritis (CEM). *Prakt. Tierarzt* 6, 503-511
144. Schneller, P. (1991): Vorkommen und Bekämpfung der kontagiösen equinen Metritis (CEM) in der Brandenburgischen Warmblutzucht. *Vet. Med. Diss. Leipzig*
145. Schulz, L.-Cl. (1991): Männliche Geschlechtsorgane. In: Schulz, L.-Cl.: *Pathologie der Haustiere*. Gustav Fischer Verlag Jena, 657-671

146. Seffner, W. (1986): Männliche Geschlechtsorgane. In : Johannsen, U., Kardevan, A., Zendulka, M. : Lehrbuch der speziellen Veterinärpathologie. VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 341-342
147. Selbitz, H.-J., Ullrich, E., Hille, G. (1987): Herstellung und Testung eines diagnostisch einsetzbaren Serums gegen *Taylorella equigenitalis* (Kurzmitteilung). Mh. Vet.-Med. 42, 480-481
148. Selbitz, H.-J., Erices, J., Ullrich, E., Liebermann, H., Örgel, I., Friedrich, U. (1988): Bakteriologische und serologische Untersuchungen an einer experimentell mit *Taylorella equigenitalis* Stamm Wien infizierten Ponystute. Mh. Vet.-Med. 43, 351-353
149. Shreeve, J.E. (1978): Preliminary observation on X-factor growth requirement of the bacterium responsible for CEM. Vet. Rec. 102, 20
150. Simons, M.A.P. und Gibson, M.W. (1978): Contagious equine Metritis. Vet. Rec. 102, 43
151. Simpson, D.J. und Eaton-Evans, W. (1978): Sites of CEM infection. Vet. Rec. 102, 488
152. Smith, J.E. und Young, C.R. (1978): AGGLUTININS TO CAUSATIVE ORGANISM OF CONTAGIOUS EQUINE METRITIS 1977 IN HUMAN SERUM. The Lancet 1, 1266
153. Sonnenschein, B. und Klug, E. (1979): Erfahrungen mit der kontagiösen equinen Metritis (CEM 77). Deutsche Tierärztl. Wschr. 86(7), 253-292
154. Sugimoto, C., Isayami, Y., Kashiwazaki, M., Fujikura, T., Mitani, K. (1980): Detection of *Haemophilus equigenitalis*, the Causal Agent of Contagious Equine Metritis, in Japan. Natl. Inst. Anim. Health Q. 20(3), 118-119
155. Sugimoto, C., Isayama, Y., Kashiwazaki, M., Mitani, K. (1981): Susceptibility of *Haemophilus equigenitalis*, the causal agent of contagious equine metritis, to 31 antimicrobial agents in horses. Natl. Inst. Anim. Health Q. 21(4), 159-162
156. Sugimoto, C., Miyagawa, E., Mitani, K., Nakazawa, M., Isayama, Y. (1982): Cellular fatty acid composition comparisons of *Haemophilus equigenitalis*. J. Clin. Microbiol. 15(5), 791-794
157. Sugimoto, C., Isayama, Y., Sahazaki, R., Kuramochi, S. (1983a): Transfer of *Haemophilus equigenitalis* Taylor et al. 1978 to the genus *Taylorella* gen. nov. as *Taylorella equigenitalis* comb nov. Curr. Microbiol. 9, 155-162
158. Sugimoto, C., Miyagawa, E., Nakazawa, M., Mitani, K., Isayama, Y. (1983b): Cellular fatty acid composition comparisons of *Haemophilus equigenitalis* and *Moraxella* species. Int. J. Syst. Bact. 33(2), 181-187

159. Sugimoto,C., Eguchi,M., Haritani,M., Isayama,Y., Kashiwazaki, M. (1988): Isolation and Charaterization of the Outer Membran of Taylorella equigenitalis. Equine infectious diseases V : proceedings of the Fifth International Conference, University Press of Kentucky, 164-167
160. Swaney,L.M. und Breese,S.S. (1980): Ultrastucture of Haemophilus equigenitalis, causative agent of contagious equine metritis. Am. J. vet. Res. 41, 127-131
161. Swaney,L.M. und Kislw,H.M. (1981): DISINFECTION OF THE CAUSATIVE AGENT OF CONTAGIOUS EQUINE METRITIS BY NOLVASAN AND ROCCAL II. Vet. Microbiol. 6(1), 59-60
162. Swaney,L.M. und Sahu,S.P. (1978): CEM: bacteriological methods. Vet. Rec. 102, 43
163. Swerczek,T.W. (1978a): The First Occurence of Contagious Equine Metritis in the United States. J. Am. vet. med. Assoc. 173, 405-407
164. Swerczek,T.W. (1978b): Contagious equine metritis in the USA. Vet. Rec. 105, 330-331,
165. Swerczek,T.W., (1978c): Inhibition of the CEM organism by the normal flora of the reproductive tract. Vet. Rec. 103, 125
166. Swerczek,T.W. (1979a): CEM in horses: assuring diagnostic precision. J. Am. vet. med. Ass. 176, 406
167. Swerczek,T.W. (1979b): CONTAGIOUS EQUINE METRITIS - OUTBREAK OF THE DISEASE IN KENTUCKY AND LABORATORY METHODS FOR DIAGNOSING THE DISEASE. J. Reprod. Fert. Suppl. 27, 361-365
168. Swerczek,T.W. (1980): A cooked blood agar medium for the contagious equine metritis organism and other fastidious bacteria. Vet. Rec. 106, 388-389
169. Swerczek,T.W. (1981): Contagious equine metritis: test for suspect carriers. Vet. Rec. 108, 420
170. Tainturier,D., Ferney,J., Royal,L. (1979): LA METRITE CONTAGIEUSE DE LA JUMENT. Revue Med. vet. 130(4), 497-518
171. Tainturier,D., Badin De Montjoye, T.,Dabernat, H.T., Ferney,J. (1981a): ETUDE EXPERIMENTALE DE LA METRITTE CONTAGIEUSE DE LA JUMENT. Revue Med. vet. 132(3), 165-171
172. Tainturier,D., Picavet,D.P., Badin De Montjoye,T., Guaguere,J., Tailliar,S., Dabernat,H.T., Ferney,J. (1981b): SEROLOGIE DE LA METRITE CONTAGIEUSE DE LA JUMENT COMPARAISON DES REACTIONS D'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE DE SEROAGGLUTINATION LENTE ET DE FIXATION DU COMPLEMENT. Ann. Rech. Vet. 12(3), 265-275

173. Tainturier,D.J., Delmas,C.F., Dabernat,H.J. (1981c): Bacteriological and serological studies of *Haemophilus equigenitalis*, agent of the contagious equine metritis. *J. Clin. Microbiol.* 14(4), 355-360
174. Tainturier,D., Talliar,S., Guagere,J., Montjoye,T.B., Ferney,J. (1982a): ETUDE EXPERIMENTALE DE LA METRITE CONTAGIEUSE DES EQUIDES. *Rev. Med. vet.* 133(1), 31-40
175. Tainturier,D., Tessier,Ph., Sardjana,K.W., Taillar,S., Ferney,J. (1982b): METRITE CONTAGIEUSE DES EQUIDES. ETUDE DE LA SURVIE D' H. EQUI-GENITALIS DANS DEUX MILIEUX DE TRANSPORT. *Rev. Med. vet.* 133(12), 765-770
176. Tainturier,D., Bruyas,J.F., Dridi,S. (1988a): Etude des symptomes provoques par quatre souches d'*Haemophilus equigenitalis* chez la Jument. *Rev. Med. vet.* 139(4), 373-378
177. Tainturier,D., Fieni,F., Bruyas,J.F., Escoulflaire,Ph. (1988b): INFLUENCE DU TREMPAGE DE LA VERGE DE L'ETALON APRES L'ACCOUPLEMENT DANS UNE SOLUTION ANTISEPTIQUE SUR LA TRANSMISSION DE LA METRITE CONTAGIEUSE DES EQUIDES. *Revue Med. vet.* 139(7), 705-708
178. Taylor,C.E.D. und Rosenthal,R.O. (1978a): AGGLUTININS TO THE ORGANISM OF CONTAGIOUS EQUINE METRITIS 1977 IN HUMAN SERUM. *The Lancet* 1, 1038
179. Taylor,C.E.D.und Rosenthal,R.O. (1978b): ORGANISM OF CONTAGIOUS EQUINE METRITIS 1977 AND HUMAN VENERAL DISEASE. *The Lancet* 2, 1092-1093
180. Taylor,C.E.D., Rosenthal,R.O., Brown,D.F.J., Lapage,S.P., Hill,L.R., Legros,R.M. (1978): The causative organism of contagious equine metritis 1977: Proposal for a new species to be known as *Haemophilus equigenitalis*. *Equine vet. J.* 10(3), 136-144
181. Taylor,C.E.D., Rosenthal,R.O., Taylor-Robinson,D. (1979): SEROLOGICAL RESPONSE OF PATIENTS WITH NONGONOCOCCAL URETHRITIS TO THE ORGANISM OF CONTAGIOUS EQUINE METRITIS 1977. *The Lancet* 1, 700-701
182. Ter Laak,E.A., Fennema,G., Jaartsveld,F.H.J. (1989): Contagious Equine Metritis in Nederland. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 114, 189-201
183. Ter Laak,A.E. und Wagenaars,C.M.F. (1990): Autoagglutination and specificity of the indirect fluorescent antibody test applied to the identification of *Taylorella equigenitalis*. *Res Vet Sci* 49(1), 117-119

184. Timoney,P.J., Ward,J., Kelly,P. (1977): A contagious genital infection of mares. Vet. Rec. 101, 103
185. Timoney,P.J., Geragthy,V.P., Dillon,P.B., McArdle,J.P. (1978a): Susceptibility of laboratory animals to infection with *Haemophilus equigenitalis*. Vet. Rec. 103, 563-564
186. Timoney,P.J., Harrington,A., McArdle,J.F., O'Reilly,P.J. (1978b): Survival properties of the causal agent of contagious equine metritis 1977. Vet. Rec. 102, 152
187. Timoney,P.J., McArdle,F.J., O'Reilly,P.J., Ward,J. (1978c): Infection Patterns in Pony Mares Challenged with the Agent of Contagious Equine Metritis 1977. Equine Vet. J. 10(3), 148-152
188. Timoney,P.J., McArdle,J., O'Reilly,P.J., Ward,J. (1978d): Experimental reproduction of contagious equine metritis in pony mares. Vet. Rec. 102, 63
189. Timoney,P.J., O'Reilly,D.J., Harrington,A.M., Mc Cormack, McArdle,J.F. (1978e): Contagious equine metritis and AI. Vet. Rec. 103, 519
190. Timoney,P.J., O'Reilly,P.J., McArdle,J., Ward,J. (1978f): Attempt transmission of contagious equine metritis 1977 to other domestic animal species. Vet. Rec. 102, 152
191. Timoney,P.J., Ward,J., Nyde,W.A. (1978g): The application of bioluminescence and gas liquid chromatography for the rapid diagnosis of contagious equine metritis 1977. Vet. Rec. 103, 243-244
192. Timoney,P.J. (1979): Contagious equine metritis in Ireland. Vet. Rec. 105, 172-173
193. Timoney,P.J., McArdle,J.F., O'Reilly,P.J., Ward,J., Harrington,A.M. (1979a): Succesful transmission of CEM to the donkey. Vet. Rec. 104, 84
194. Timoney,P.J., O'Reilly,P.J., Harrington, M.A., McCormack,R., McArdle,J.F. (1979b): Survival of *Haemophilus equigenitalis* in different antibiotic containing semen extenders. J. Reprod. Fert. Suppl. 27, 377-381
195. Timoney,P.J., O'Reilly,P.J., McArdle,J.F., Ward,J., Harrington,A.M. (1979c): Response of mares to rechallenge with organism of contagious equine metritis 1977. Vet. Rec. 104, 264
196. Timoney,P.J., O'Reilly,P.J., McArdle,J.F., Ward,J., Harrington,A.M., McCormack,R. (1979d): Response of pony mares to the agent of contagious equine metritis 1977. J. Reprod. Fert. Suppl. 27, 367-375
197. Timoney,P.J., Ward,J., McArdle,J.F., Harrington,A.M. (1979e): Thermal death times of the organism of contagious equine metritis 1977. Vet. Rec. 104, 530
198. Timoney,P.J. und Powell,D.G. (1982): Isolation of contagious equine metritis organism from colts and fillies in the United Kingdom and Ireland. Vet. Rec. 111, 478-482

199. Timoney,P.J., Shin,S.J., Jacobson,R.H. (1982): Improved selective medium for isolation of the contagious equine metritis organism. Vet. Rec. 111, 107-108
200. Timoney,P.J. und Strickland,K.L. (1982): CEM in the Republic Ireland. Vet. Rec. 111, 400-401
201. Timoney,P.J., Shin,S.J., Huntress,C., Strickland,K.L. (1983): Activity of cefataxime, a  $\beta$ -lactam antibiotic against the contagious equine metritis organism. Vet. Rec. 112, 569-570
202. Timoney,P.J., Shin,S.J., Lein,D.H., Jacobson,R.H. (1984): Transmissibility of the contagious equine metritis organism for the cat. Comp. immun. Microbiol. Infect. Dis. 7, 131-140
203. Timoney,P.J., O'Reily,P.J., McArdle,J.F., Ward,J., Harrington,A.M. (1985): Contagious equine metritis experimental infection in the donkeys. Vet. Microbiol. 10(3), 259-268
204. Timoney,P.J. und Powell,D.G. (1988): CONTAGIOUS EQUINE METRITIS-EPIDEMIOLOGY AND CONTROL. J. of Equine Vet. Sci. 8(1), 42-46
205. Ullrich,E. (1990): Bakteriologische und serologische Untersuchungen zur Diagnostik und zum Erreger-Wirt-Verhältnis der Kontagiösen equinen Metritis (CEM) bei Stuten. Vet. Med. Diss. Leipzig
206. Ullrich,E., Selbitz,H.J., Liebermann,H. (1987): Die kontagiöse equine Metritis - eine bakteriell bedingte, in der DDR nicht heimische Infektionskrankheit (Übersichtsreferat). Mh. Vet.-Med. 42, 51-56
207. Ullrich,E. und Selbitz,H.J. (1989): Gewinnung eines Antiserums gegen Taylorella equigenitalis von immunisierten Ponys. Mh. Vet.-Med. 44, 647-648
208. Vaissaire,J., Plateau,E., Collobert-Laugier,C. (1986): La metrite contagieuse equine a haemophilus equigenitalis: situation en France. Bull. Acad. Vet. de France 59, 375-384
209. Vaissaire,J., Plateau,E., Collobert-Laugier,C. (1987): Importance du microbisme dans les spermes d'etalons. Bull. Acad. de France 60(2), 165-175
210. Vaissaire,J., Coconnier,M.-H., Le Gouic,M. (1989): La metritite contagieuse equine: SITUATION SANITAIRE ACTUELLE EN FRANCE. Bull. Acad. Vet. de France 62, 87-97
211. Wada,R., Kamada,M., Fukunaga,Y., Kumanomido,T. (1983): Studies on Contagious Equine Metritis: IV. Pathology in Horses Experimentally Infected with Haemophilus equigenitalis. Bull. of Equine Res. Inst. 20, 133-144
212. Ward,J., Hourigan,M., McGuirk,J., Gogarty,A. (1984): Incubation times for primary isolation of the contagious equine metritis organism. Vet. Rec. 114, 298



213. Widders,P.R., Stoches,C.R., Newby,T.J., Bounre, F.J. (1985): Nonimmune Binding of Equine Immunglobulin by the causative organism of Contagious Equine Metritis *Taylorella equigenitalis*. Infect. and Immun. 48(2), 417-421
214. Widders,P.R., Stokes,C.R., David,J.S.E., Bourne,F.J. (1986): Specific antibody in the equine genital tract following local immunisation and challenge infection with contagious equine metritis organism (*Taylorella equigenitalis*). Res. Vet. Sci. 40, 54-58
215. Wilkinson,A.E.und Rodin,P. (1978): Organism of contagious equine metritis 1977 in human venereal disease. The Lancet 2, 1093
216. Wyffels,R. (1989): Besmettelijke metritis bij paarden: in vitro antibioticumm gevoeligheid van enkele belgische *Taylorella equigenitalis* stammen. Vlaams. Diergeneeskd. T. 58(2), 171-172
217. Zinnemann,K. (1980): Newer Knowledge in Classification, Taxonomy and Pathogenicity of Species in the Genus *Haemophilus*. A Critical Review. Ztbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 247, 248-258

Abb. 9: Reaktion des mAK TF I 10D5 im ELISA  
Exinktion bei 495 nm (1000x)

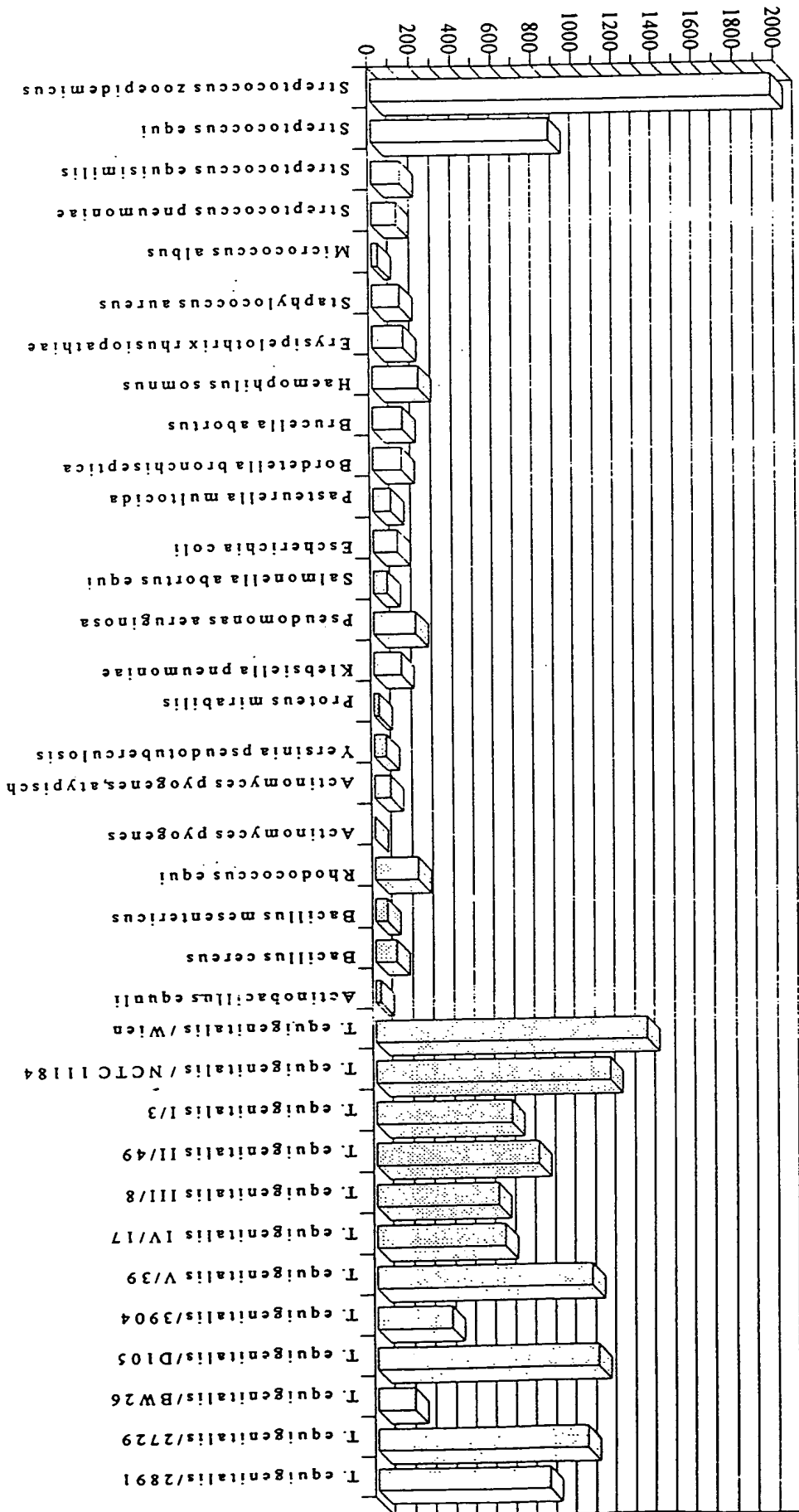


Abb. 10: Reaktion des mAK TF II 8D4 im ELISA  
Extinktion bei 495 nm (1000x)

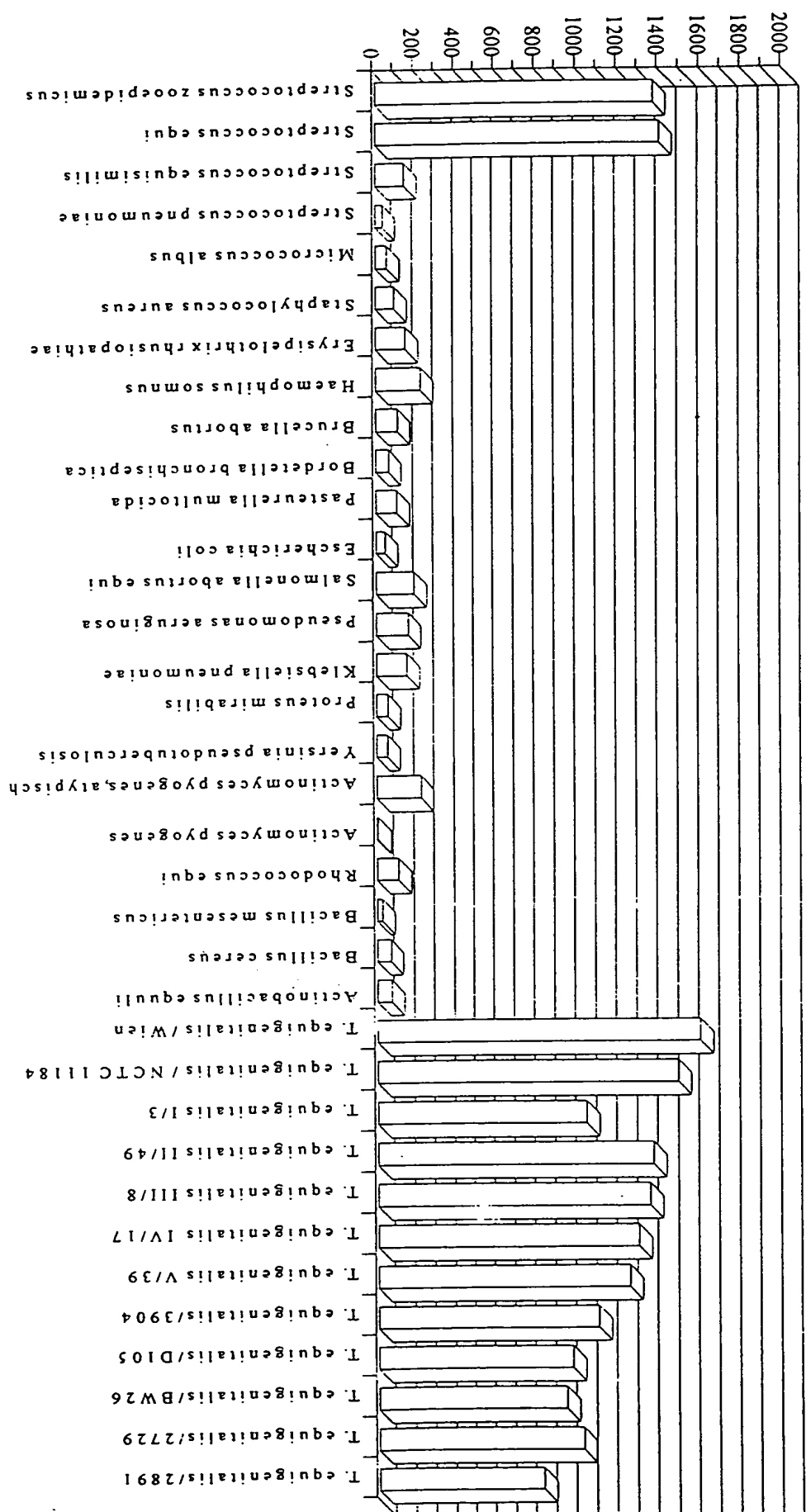


Abb. 11: Reaktion des mAK TF III 7D4 im ELISA  
 Extinktion bei 495 nm (1000x)

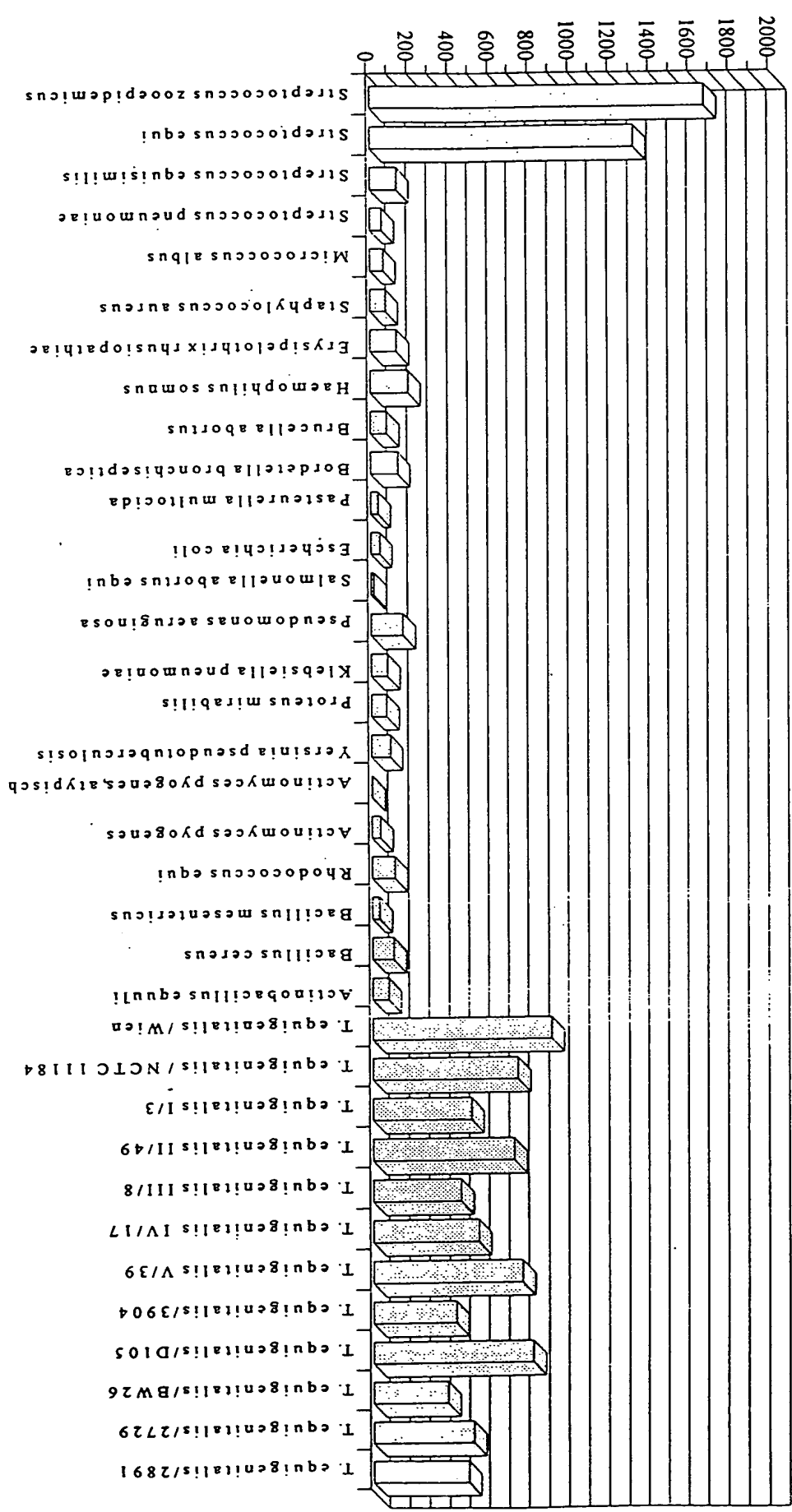


Abb. 12: Reaktion des mAK TF III 11E5 im ELISA  
Extinktion bei 495 nm (1000x)

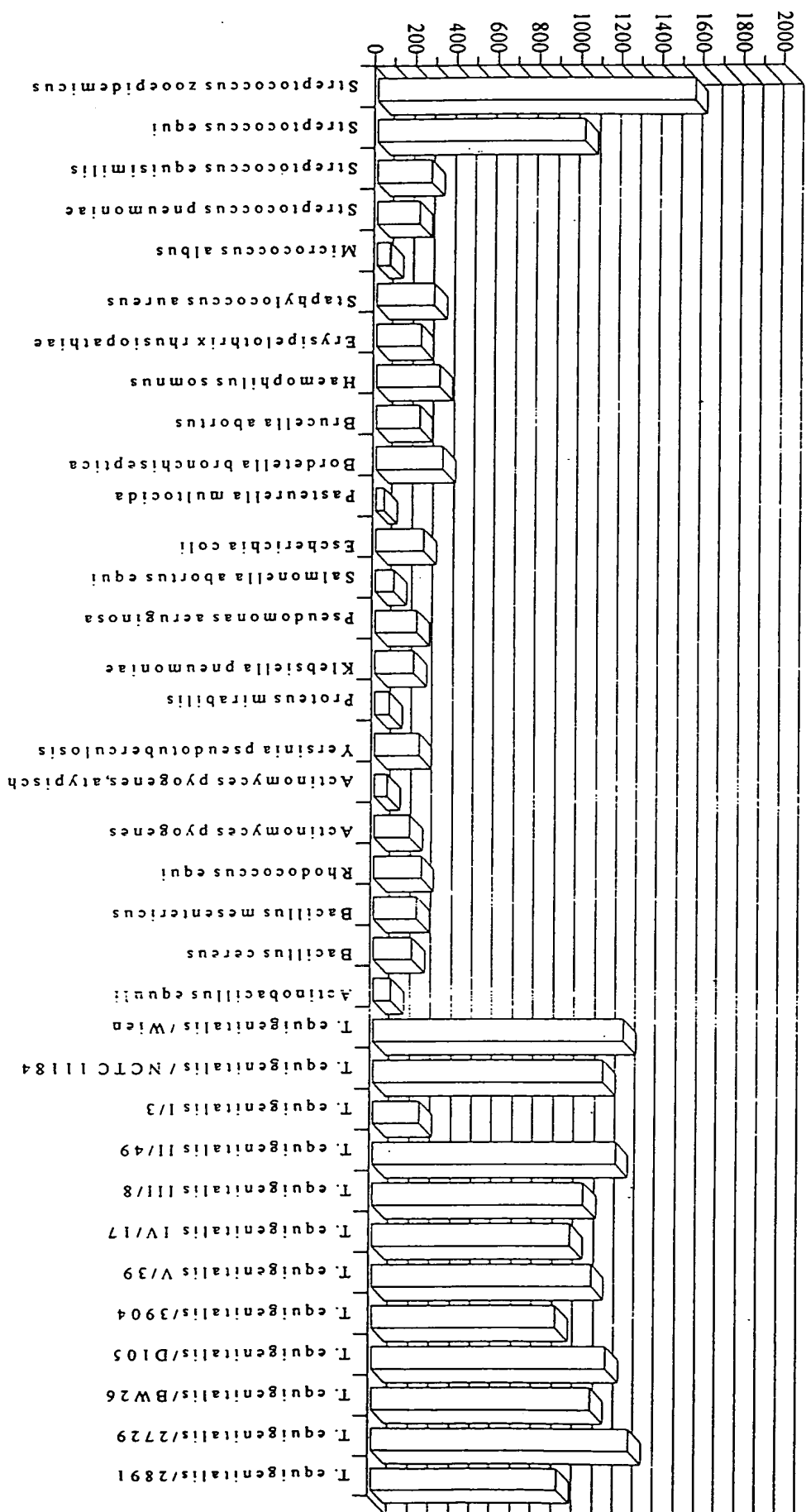


Abb. 13: Reaktion des mAK TF III 10G5 im ELISA  
Exinktion bei 495 nm (1000x)

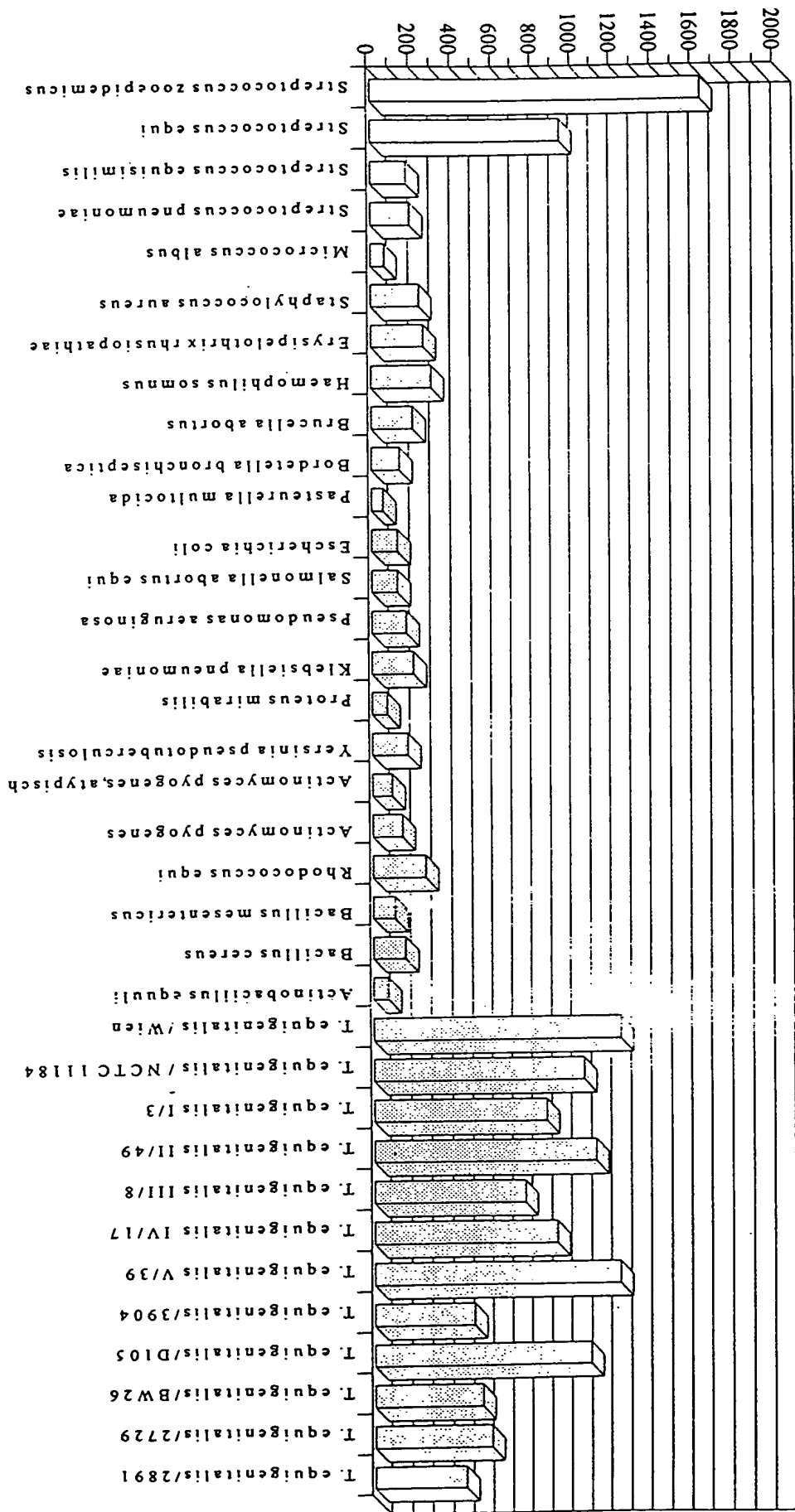


Abb. 14: Reaktion des mAK TF III 11B5 im ELISA

Extinktion bei 495 nm (1000x)

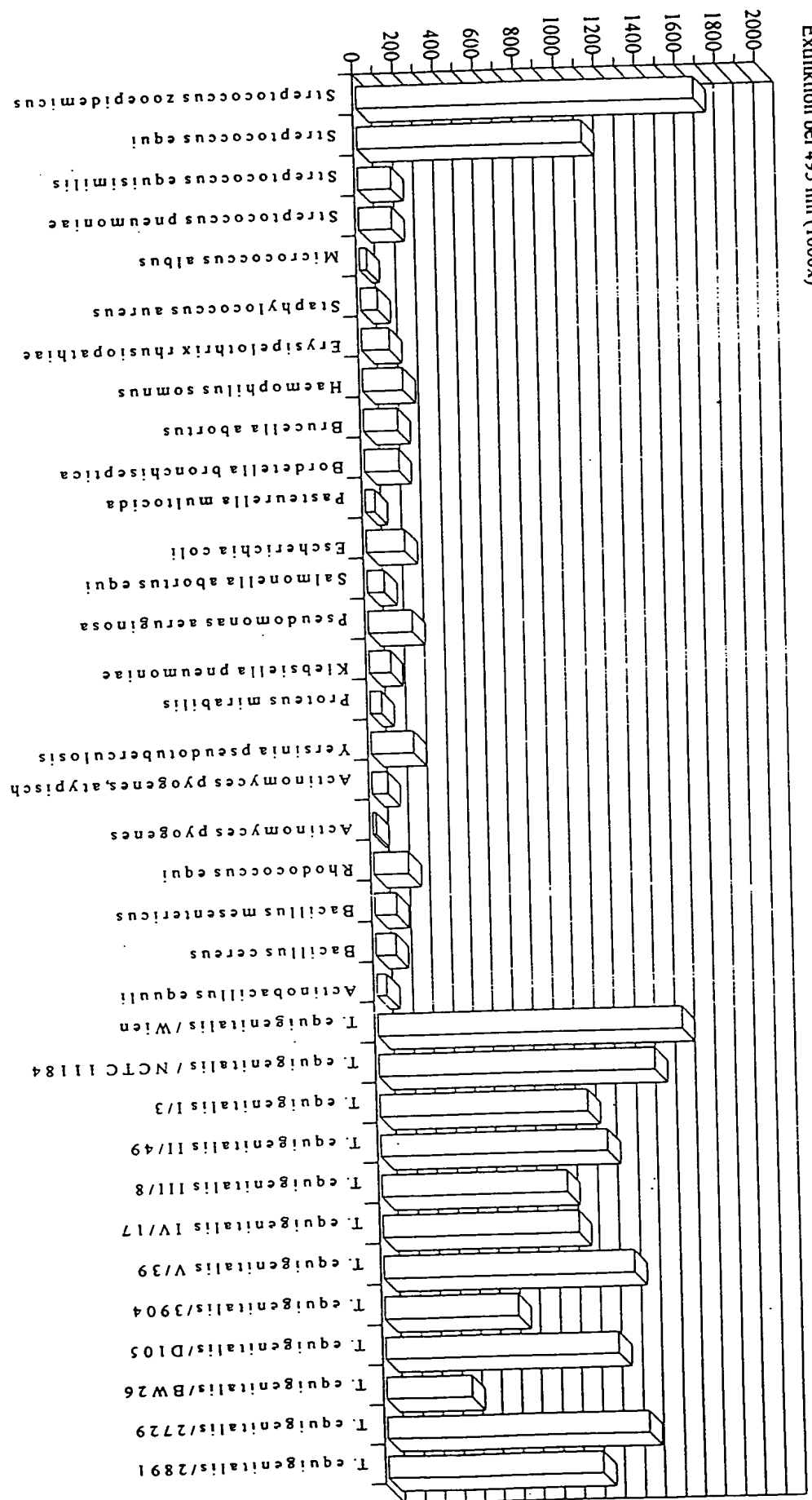


Abb. 15: Reaktion des mAK TF III 3G3 im ELISA  
Extinktion bei 495 nm (1000x)

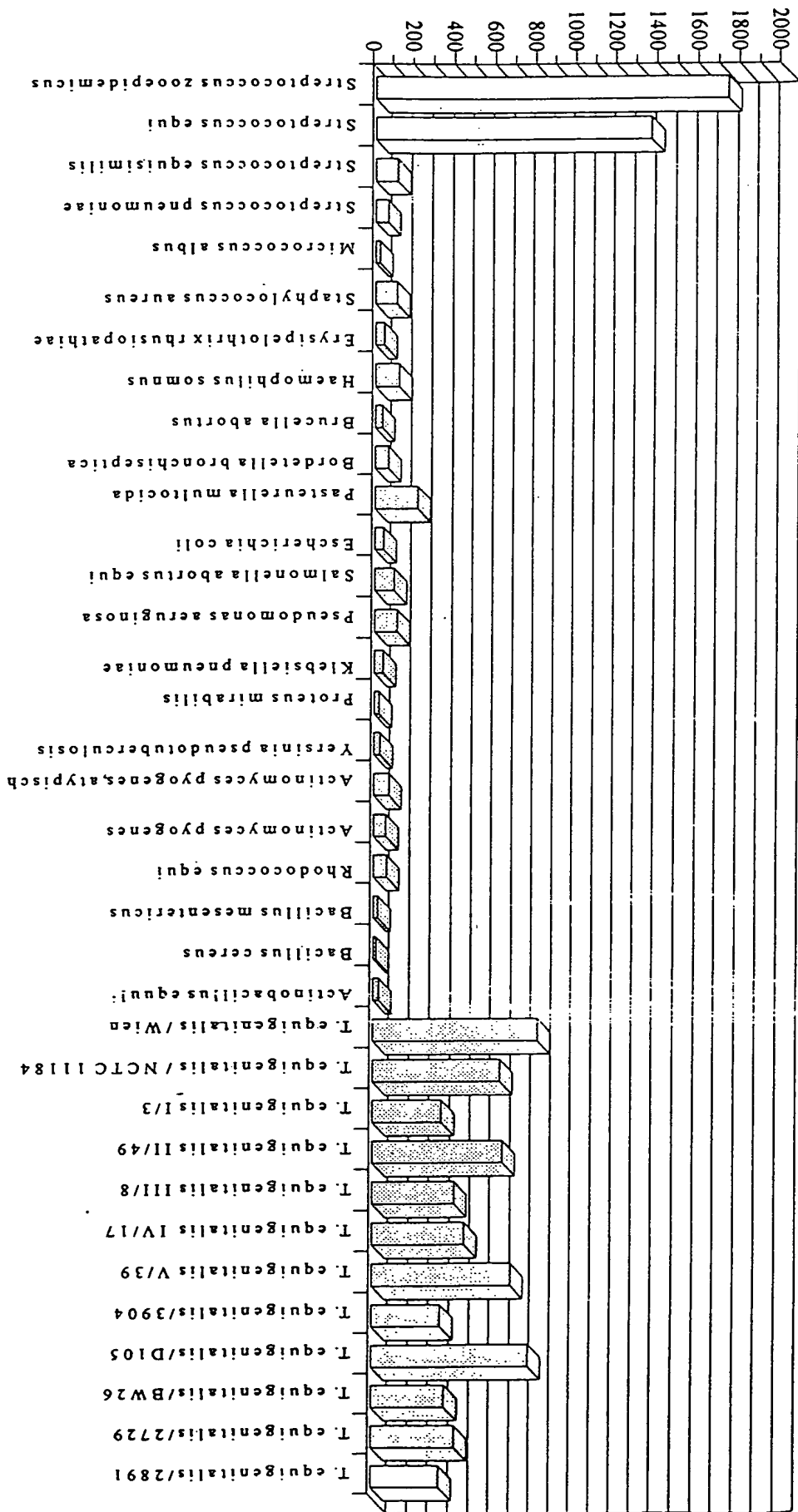




Abb. 16: Reaktion des mAK TF III 3E8 im ELISA  
Exinktion bei 495 nm (1000x)

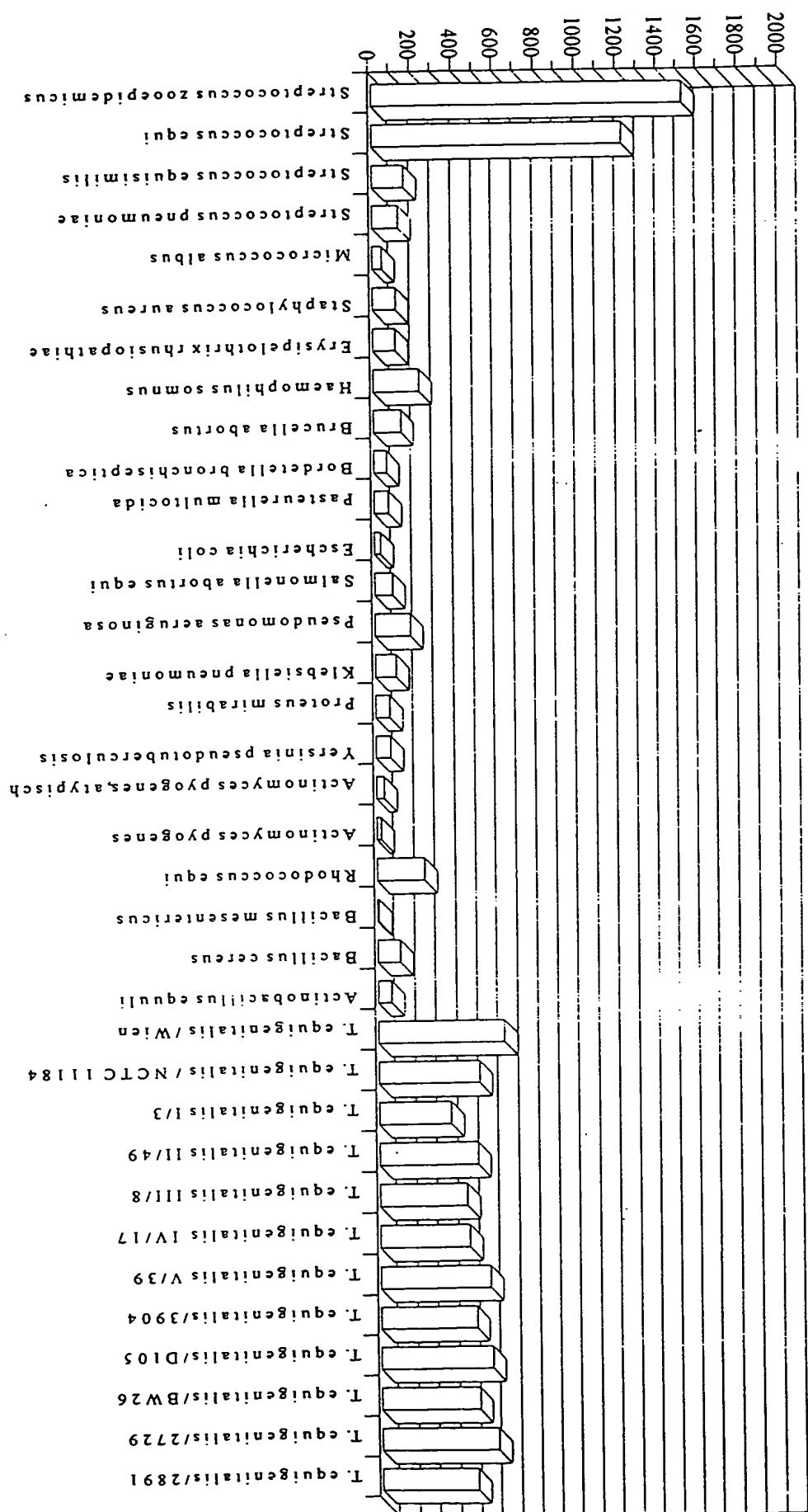


Abb. 17: Reaktion des Mausemmunserums im ELISA  
Exinktion bei 495 nm (1000x)

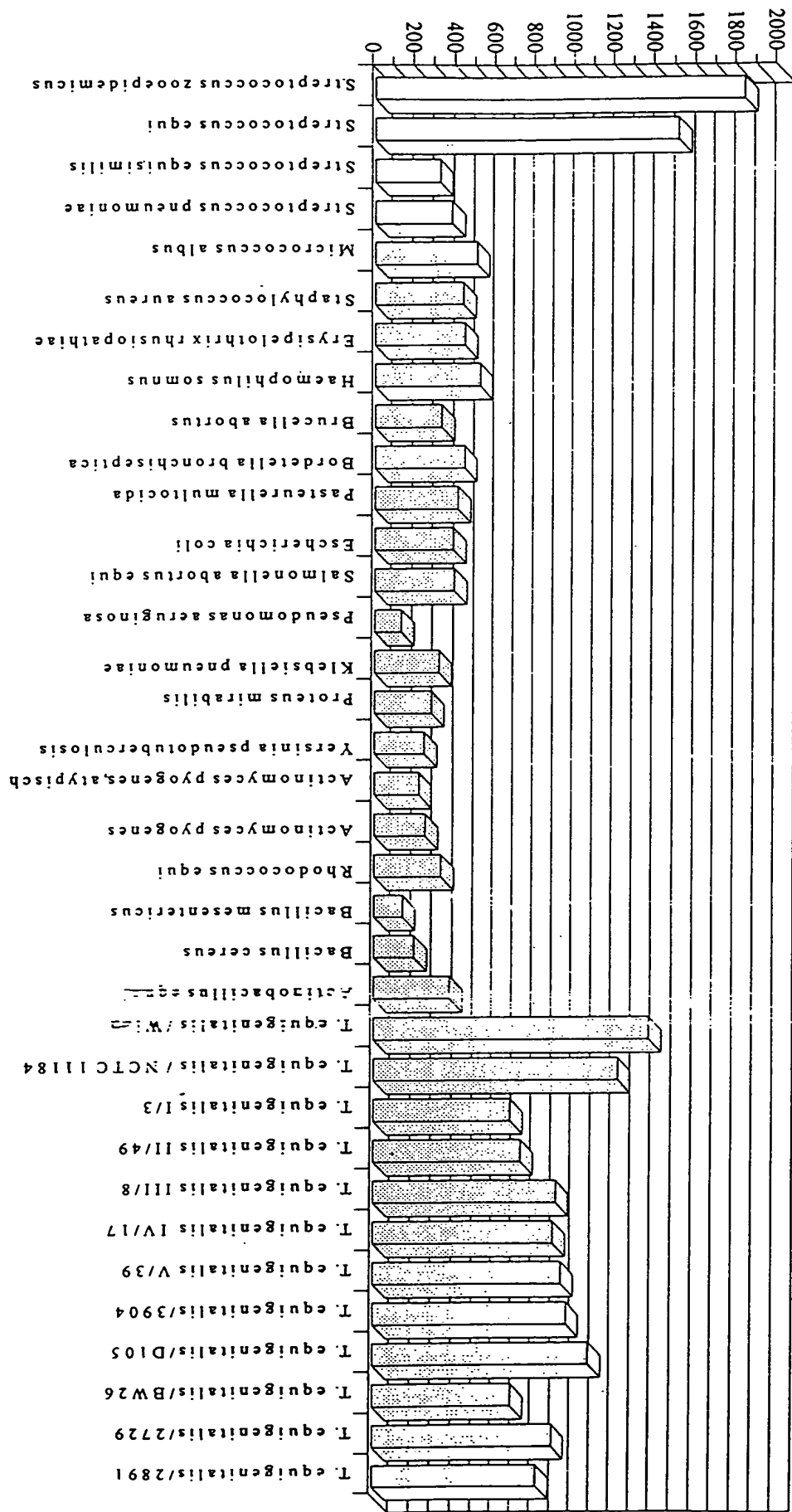


Abb. 18: Reaktion des mAK Kufu 2 im ELISA

Extinktion bei 495 nm (1000x)

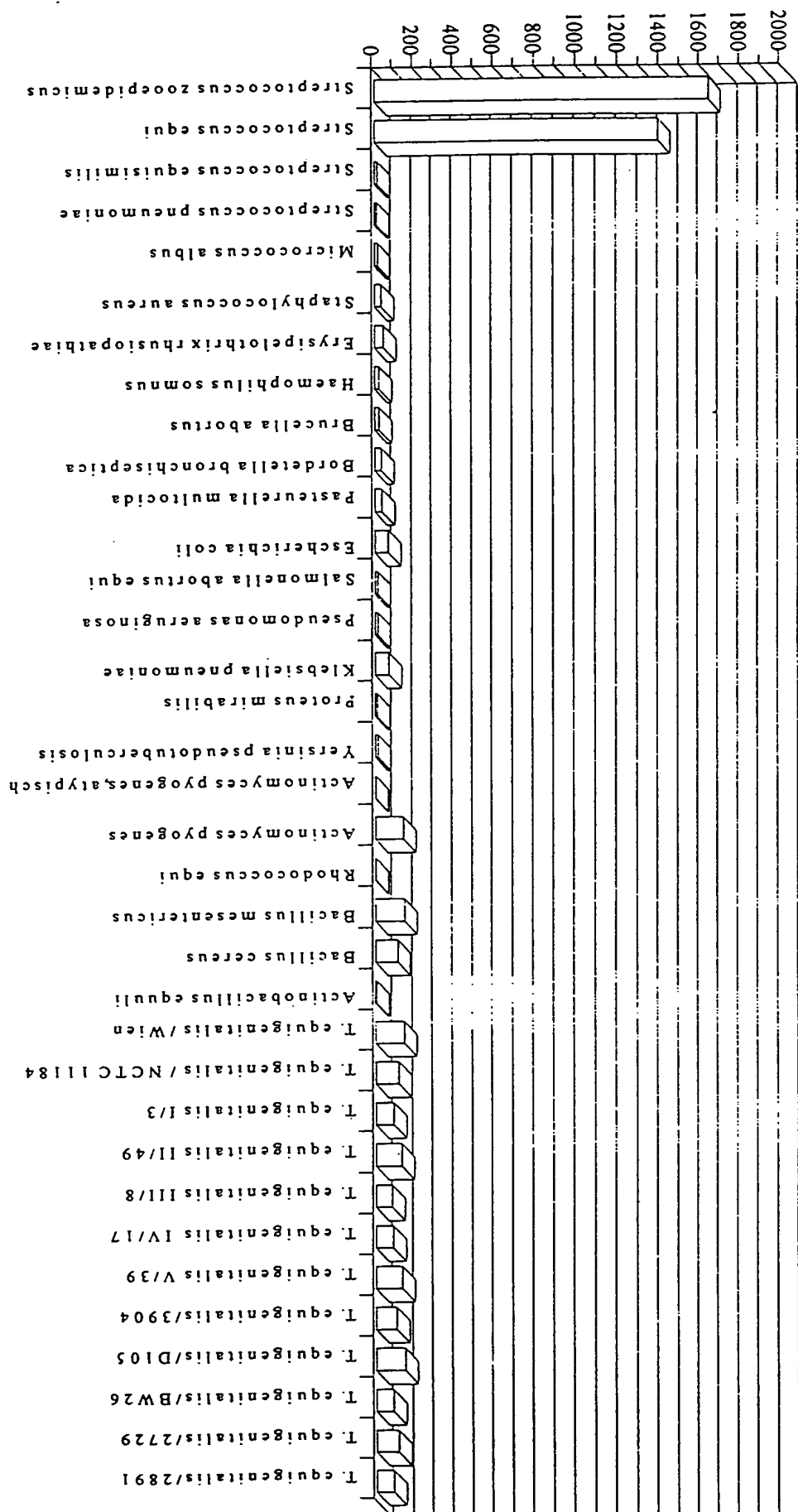


Abb. 19: Konjugatkontrolle

Extinktion bei 495 nm (1000x)

